ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1961 N° 16

Contribution à l'Étude Bactériologique des Saucisses Flore Staphylococcique

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Mars 1961

DEVANT LA

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

MICHEL-FRANÇOIS-MARIE GALLITRE

Né le 14 Octobre 1936, à LUSSAT (Creuse)

JURY

Président : M. ANDRIEU, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. SAURAT, Professeur à l'École Vétérinaire.

M. LAUTIÉ, Professeur à l'École Vétérinaire.

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

1961

MINISTERE DE L'AGRICULTURE

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

PERSONNEL ENSEIGNANT

	MM.
DIRECTEUR	PONS
PROFESSEUR HONORAIRE	LASSERRE

PROFESSEURS

	MM.
Physique - Chimie Biologique Pharmacie - Toxicologie Hygiène du lait	GODFRAIN
Anatomie descriptive - Extérieur Anatomie appliquée	BLIN
Physiologie Pharmacodynamie - Thérapeutique	LE BARS
Histologie - Embryologie Anatomie Pathologique Inspection des viandes	LOMBARD
Zoologie appliquée - Botanique Parasitologie externe Parasitologie interne	BRIZARD
Pathologie médicale des Equidés et Carnivores Législation Vétérinaire	DARRASPEN
Pathologie médicale du bétail et des animaux de basse-cour	TOURNUT
Pathologie chirurgicale Technique chirurgicale	PUGET
Pathologie de la Reproduction Obstétrique	BERTHELON
Microbiologie - Immunologie Maladies contagieuses Police sanitaire	SAURAT
Ethnologie Hygiène Agronomie Alimentation Zootechnie générale Economie rurale	PONS

CHEFS DE TRAVAUX

	MM.
Maladies contagieuses	LAUTIE, Agrégé
Zootechnie	FALIU, Agrégé
Pathologie Médicale - Législation Vétérinaire	LESCURE, Agrégé
Anatomie pathologique	GOULARD
Pathologie Chirurgicale	CAZIEUX
Pathologie de la Reproduction	ROYAL
Chimie Biologique - Pharmacie	MILHAUD

CHARGES

D'ENSEIGNEMENT. – COURS COMPLEMENTAIRES

	MM.
Radiologie	AUVERGNAT
Droit vétérinaire	LINON
Botanique	MORQUER
Pisciculture	SECONDAT
Agronomie	BRISEBOIS
Economie Rurale	MONTANE DE LA ROQUE

ASSISTANT

Pathologie Médicale du Bétail	M. LACAZE.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (Délibération de la Faculté, en date du 10 mai 1891 et du Conseil de l'Ecole, en date du 13 juin 1924).

ECOLE NATIONALE VÉTÉRINAIRE DE TOULOUSE

ANNÉE 1961 N° 16

Contribution à l'Étude Bactériologique des Saucisses Flore Staphylococcique

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT VÉTÉRINAIRE

(Diplôme d'État)

Présentée et soutenue publiquement en Mars 1961

DEVANT LA

Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Toulouse

PAR

MICHEL-FRANÇOIS-MARIE GALLITRE

Né le 14 Octobre 1936, à LUSSAT (Creuse)

JURY

Président : M. ANDRIEU, Professeur à la Faculté de Médecine.

Assesseurs : M. SAURAT, Professeur à l'École Vétérinaire.

M. LAUTIÉ, Professeur à l'École Vétérinaire.

IMPRIMERIE SOUBIRON

9, Rue de la Poste

TOULOUSE

1961

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Contribution à l'Étude Bactériologique des Saucisses
Flore Staphylococcique

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546524_0111

A MES PARENTS

A MON FRERE

A MON PARRAIN

A MES AMIS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

Monsieur le Professeur

de la Faculté de Médecine de Toulouse

Qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

A NOTRE JURY DE THESE :

Monsieur le Professeur SAURAT

de l'Ecole Vétérinaire de TOULOUSE

Qui nous a accepté dans son Laboratoire et qui nous a fait le grand Honneur de nous confier le sujet de cette thèse. Qu'il veuille ici trouver l'expression de notre gratitude et de notre profond respect.

Monsieur l'Agrégé LAUTIE

de l'Ecole Vétérinaire de Toulouse

Qui nous guida dans notre travail avec la plus grande bienveillance.
Hommages reconnaissants.

A TOUS NOS MAITRES DE L'ECOLE VETERINAIRE DE TOULOUSE.

INTRODUCTION

On effectue dans presque toutes les nations européennes une surveillance sérieuse des nombreuses variétés de produits alimentaires mises à la disposition des consommateurs. Elle affecte surtout la forme d'un contrôle de la qualité marchande, et s'évertue à déceler les fraudes portant sur celles-ci ; on recherche soigneusement par exemple, le taux des matières grasses du lait, celui de l'alcool des vins, ou de l'humidité des pâtes, la teneur en sucre des confitures. De plus, on dépiste tous les produits chimiques toxiques qui peuvent porter atteinte à la santé publique. Ces tâches sont confiées en règle générale à des chimistes ; c'est le cas du personnel des laboratoires de la répression des fraudes en France et de celui des services similaires anglais et hollandais.

Cependant on a négligé manifestement le rôle nocif joué par les contaminations ou altérations d'ordre microbiologique. On a sous-estimé leur fréquence dans notre vie moderne, et on a trop souvent omis de prendre les mesures nécessaires pour les dépister et les supprimer. Le nombre des toxi-infections alimentaires est incroyablement plus grand que celui des intoxications chimiques dûes à l'absorption de produits frauduleux.

Malgré des thérapeutiques efficaces contre les bactéries responsables, la fréquence de ces maladies augmente sans cesse. Il nous suffira de citer les statistiques anglaises des années 1954 et 1955 : 6 016 cas et 8 961 cas ont été déclarés au cours de ces deux années. (1) (2).

Cet apparent paradoxe du siècle de l'hygiène s'explique aisément : il y a trente ans chacun prenait ses repas au foyer familial ; aujourd'hui les restaurants collectifs d'usines, d'administrations, d'écoles, se multiplient sans cesse ; ainsi un aliment souillé fait cent ou mille fois plus de victimes qu'autrefois. De plus ces mêmes intoxications étaient dues au Clostridium botulinum ou aux Salmonelles ; or depuis quelques années, la fréquence de celles dues aux "Staphylocoques" ne cesse d'augmenter. Il n'est

pas actuellement en effet d'affections plus fréquentes que celles dues à ces germes. L'importance de celui-ci semble avoir augmenté du fait de l'accroissement du nombre des infections "staphylococciques", conséquence de l'acquisition rapide par ce germe d'une résistance à la plupart des antibiotiques classiquement utilisés.

C'est cette question qui préoccupa nos maîtres, Monsieur le Professeur Saurat et Monsieur l'agrégé Lautié de l'école vétérinaire de Toulouse, quand ils nous proposèrent le sujet de cette thèse.

L'essentiel de ce travail consistera donc dans l'étude systématique des différents lots de saucisse recueillis dans les charcuteries de la ville de Toulouse. Nous effectuerons une numération totale des germes contenus dans celles-ci, nous isolerons les "staphylocoques" en employant divers milieux sélectifs, nous étudierons par la suite le pouvoir pathogène de ces mêmes germes, et nous rechercherons également les germes indologènes et sulfhydrogènes pour avoir une idée plus étendue de la flore microbienne contenue dans ces produits. Nous envisagerons également la variation de cette flore dans le temps en laissant différents lots de saucisses aux températures de + 20° et + 4° C, et en effectuant des analyses tous les mois.

L'exposé de cette étude a été divisé en plusieurs chapitres. Nous verrons successivement :

CHAPITRE I : Les intoxications alimentaires à "Staphylocoques"
- 1 - Historique, Fréquence
- 2 - Etiologie
- 3 - Symptômes
- 4 - Diagnostic
- 5 - Pathogénie
- 6 - Prophylaxie

CHAPITRE II - L'agent responsable : Le "Staphylocoque".
- Etude particulière des procédés de caractérisation des "Staphylocoques" pathogènes.
- 1 - Diagnostic du genre Micrococcus
- 2 - Diagnostic de l'espèce Micrococcus pyogenes.
- 3 - Mise en évidence du caractère pathogène.

CHAPITRE III- Recherches personnelles
- 1 - Les techniques employées.
- 2 - Les résultats obtenus.
- 3 - Les applications et les Conclusions.

Une large part sera faite dans le chapitre premier aux toxi-infections alimentaires d'origine "staphylococcique" qui prennent à l'heure actuelle, comme nous l'avons dit plus haut, une importance considérable. L'Historique, l'Etiologie, le Diagnostic et la Pathogénie de ces dernières retiendront assez longuement notre attention, ceci pour nous permettre d'essayer de mieux comprendre les problèmes souvent délicats et complexes que posent ces intoxications alimentaires.

Nous nous efforcerons également de jeter les bases d'une prophylaxie de ces toxi-infections dans lesquelles le vétérinaire, à qui incombe le soin de la santé de l'homme à travers le contrôle hygiénique des aliments, aura un rôle primordial à jouer.

CHAPITRE I

LES INTOXICATIONS ALIMENTAIRES A "STAPHYLOCOQUES" (1)

I. HISTORIQUE - FREQUENCE

Devant le nombre imposant de communications sur les intoxications alimentaires d'origine "staphylococcique", il nous a semblé bon, au lieu de ne donner qu'un exposé chronologique de celles-ci, de les classer selon l'origine et la nature des produits alimentaires responsables.

1. Viande

Dès 1894, Denys (3), à l'Académie Royale de Médecine Belge, signalait une intoxication familiale déterminée par l'ingestion de viande d'une vache infectée de "staphylocoques".

Aux Etats-Unis, Owen (4), en 1906, mettait le même germe en évidence dans une viande de boeuf considérée comme étant à l'origine de troubles gastro-intestinaux aigus chez quatre-vingt-dix personnes.

Costa Mandry (5) rapporta un épisode dû à l'absorption de jambon ; Tipton et Smiley (6) signalèrent plus de 2800 cas d'intoxications par le jambon fumé, dix-sept cas d'intoxication par du porc furent également signalés à cette époque (7) et les "staphylocoques" isolés de ces dix-sept cas, sécrétaient de la coagulase.

D'autres intoxications sont encore rapportées, dues au Corned Beef (Slater) (8), au jambon cuit (Scott et Stewart) (9) ; Monal (10) a pu isoler de nombreux "staphylocoques" pathogènes dans les diarrhées et les vomissements des enfants.

(1) Ayant commencé nos recherches en 1957, nous avons travaillé sur la clé du Bergey's Manual de 1948, or le genre "Staphylococcus" n'existait pas dans cette terminologie ; nous devrions donc parler ici de Microcoques et non pas de "staphylocoques". Nous emploierons cependant ce terme tout au long de cet exposé pour désigner l'ensemble des Cocci isolés sur milieu de Chapman.

Quant à Dack, Bowman et Harger (11), ils ont rapporté deux-cent-six intoxications causées par des sandwiches à la langue de boeuf, souillés par un "staphylocoque" doré hémolytique qui se révéla, chez le singe, "du type poison alimentaire", et, Monacci et Vivoli (12), une intoxication portant sur quarante-huit personnes après ingestion de viande de porc hachée.

2. Lait - Fromages

Un lait de mammite, renfermant un "staphylocoque" blanc provoqua une intoxication alimentaire aux Philippines en 1914, et Barber (13) fit la première démonstration expérimentale de l'empoisonnement dû au "staphylocoque", il observa en effet des symptômes typiques d'intoxication chez des volontaires après ingestion de ce même lait.

Geiger, Crowley et Gray (14) constatèrent en 1935 une intoxication alimentaire par les "staphylocoques", avec vomissements, douleur gastrique et diarrhée ; plus de trente cas de gastro-entérites dues à du lait contaminé furent ainsi observés en Amérique (15).

Oscar Felsenfeld (16) signala un cas d'intoxication après absorption de lait et isola un "staphylocoque" hémolytique agglutiné par le sérum du malade au taux de 1/320. L'administration par voie buccale à des cobayes et à des lapins donna des résultats négatifs. Par contre, un sujet humain volontaire présenta des symptômes pathognomoniques.

Acquarone et Liech (17) rapportèrent une intoxication causée par la consommation de fromage de brebis, et Hackler (18) une intoxication due à l'emploi de lait pasteurisé.

En France, la première publication sur ce sujet a été faite dans les "Annales de Médecine Légale" par Derobert, Truffet et Navellier (19), qui signalèrent deux cas d'intoxications mortelles chez deux nourrissons ayant ingéré du lait condensé sucré dans lequel ils mirent en évidence un "Staphylocoque" dont ils ne précisèrent pas le caractère toxique.

Blanchard et Thieulin (20) signalèrent de leur côté, la présence de "staphylocoques" blancs et dorés dans des laits concentrés sucrés d'origine étrangère.

Enfin, en 1959, des auteurs roumains (21) ont isolé une souche de "staphylocoque" du lait de mammite de brebis, ayant servi à la fabrication d'un fromage à l'origine

d'intoxications alimentaires ; ce même "staphylocoque" se révéla négatif à tous les tests de caractérisation du pouvoir pathogène, sauf au Kitten test.

3. Gateaux - Crèmes

Castline et Thompson (22) en 1937 firent état de trente et une intoxications dues à des crèmes ; d'autres auteurs rapportèrent alors des empoisonnements après ingestion d'éclairs au chocolat (23).

Pikkarainen (24) isola de gâteaux, ayant causé un empoisonnement, des "staphylocoques" dorés, doués d'un pouvoir hémolytique.

Kuhn et Kilbourne (25) relatèrent une intoxication due à des gâteaux, et, Roberts, Veadman et Elliott, une intoxication ayant pour cause de la patisserie.

Bam (26) a décrit un épisode de toxi-infection dûe à la consommation de crème.

Paul de Lay (27) rapporta l'histoire d'une épidémie qui atteignit quatre cents hommes de l'armée américaine et fut consécutive à l'absorption d'un pudding infecté par le "staphylocoque".

Williams et coll. (28) ont constaté plusieurs intoxications dues à des glaces à la crème et atteignant quarante, cinquante huit et cinq cents personnes, et T. Rosati (29) a pu mettre en évidence des "staphylocoques" entérotoxiques dans cinq de quatre-vingt-dix échantillons de glaces examinés.

Ritchie, Murray et Holgate (30) rapportèrent une intoxication portant sur cent-soixante-et-onze personnes dont quatre-vingt-dix-sept durent être hospitalisées après absorption de gâteaux infectés par le "staphylocoque".

Monacci (31) a rapporté une intoxication atteignant plus de cinq-cents personnes ayant consommé des glaces à la crème qui renfermaient de nombreux "staphylocoques" entérotoxiques ; Giovanardi (31) trente cas d'intoxications après ingestion de glaces dans lesquelles un "staphylocoque" entérotoxique était présent en fortes proportions.

Biffi et Gentili signalèrent un peu plus tard quatre-vingt-dix cas d'intoxication après consommation de gâteaux à la crème.

Enfin, en 1957, Huet (32) rapporta une intoxication alimentaire "staphylococcique" après ingestion de crème glacée du type "Eskimo" ; le nombre des "Staphylocoques" était de cinq millions au gramme ; quant au germe isolé, il se révéla coagulase +, mannitol +, et donna une réaction positive au kitten test.

4. Conserves

Suzzi-Valli (33) rapporta une intoxication ayant touché douze personnes qui avaient consommé du thon à l'huile.

Monacci et Crispino (34), et Mitrovic (35) signalèrent l'intoxication de treize personnes ayant ingéré des filets de maquereaux à l'huile.

Morozzi (36) a rapporté trois foyers d'intoxications ayant également pour cause la consommation de maquereaux à l'huile.

J. Boyer et coll. (37) ont constaté 34 cas d'intoxications provoquées par l'ingestion de sardines à l'huile et de rillettes.

En 1955, à Toulouse, MM. J. Gadrat, J. Quercy et Bes (38) rapportèrent une intoxication de dix adultes par une conserve de sardines, souillée de "staphylocoques" entérotoxiques. A côté d'une symptômatologie classique, ils notèrent une température supérieure à 38° C chez neuf sur dix des malades et surtout une bradycardie chez sept d'entre eux, apparue le deuxième ou le troisième jour, et qui a duré 6 jours ; c'était une bradycardie sinusale avec altération discrète des tracés électrocardiographiques ; cette bradycardie est à rapprocher du syndrome vago-mimétique individualisé par Marcais et Loyer dans les intoxications alimentaires dues à l'absorption d'allergènes divers.

5. Charcuterie

En 1937, Timmerman (39) rapporta des empoisonnements alimentaires par du saucisson de foie.

F. C. Minett (40) relata, un an plus tard, une intoxication par du pâté de poulet et de porc.

Signalons encore les communications de Oddy et Clerg (41) ayant trait à cent-soixante-sept mineurs ayant consommé des sandwiches de boeuf mariné, et de Bealn (42) concernant neuf personnes ayant ingéré du pâté de viande

En 1951, Tassi et Ignesti (43) ont constaté treize cas d'empoisonnements par absorption de saucisson sec de porc ; Névot et coll. (44) trois foyers consécutifs à l'ingestion de viande et de produits de charcuterie, largement souillés de "staphylocoques" ; Remo Coppini (45), un certain nombre de cas après ingestion de pâté de porc.

Gianelli (46), en 1952 rapporta l'observation de trois personnes d'une même famille ayant présenté les signes d'une intoxication à la suite de l'ingestion de mortadelle. L'examen bactériologique de celle-ci permit d'isoler une souche de Staphylococcus aureus, mannitol +, coagulase +, hémolytique α + et β +, non fibrinolytique et liquéfiant la gélatine. Tenant compte de la thermorésistance des cocci lorsqu'ils se trouvent en présence du gras, l'auteur estime que la résistance de celui-ci à la cuisson de la mortadelle en cause doit être liée au même comportement.

6. Origines Diverses

En 1928, Nelson (47) signala une série d'intoxications alimentaires.

En 1930, époque à laquelles les intoxications d'origine "staphylococcique" connaissaient un renouveau d'actualité, les Américains, Dack, Jordan (48), Burnows, Dolman et les Anglais Savage, Lawrence signalèrent en effet à partir de cette date une centaine d'épidémies provoquées par des "staphylocoques" souillant lait, fromage, gâteaux, viande, poissons. Un "staphylocoque" doré contenu dans un pâté intoxiqua par exemple dix personnes à Chicago en 1930.

D'autres intoxications furent rapportées par la suite par Tanner et Ramsey (49, Mc Burney (50), Crabtree et Litterer (511 et Jordan et Burrows (52) ; citons encore les observations de Denison, de Shaugnessy et Grubb (53) et de Geiger (54).

En 1938, P. Majors et coll. (55) ont isolé d'huîtres ayant produit une intoxication alimentaire, un "staphylocoque" produisant une entérotoxine donnant un kitten test positif.

Citons encore les observations de Caudill et Humphrey (56) portant sur trente-et-un cas d'intoxications par une sauce hollandaise et celle de Wade (57) et de Wilson (58).

De leur côté, A. Giovanardi et Stoppa (59) signalèrent en 1939, des intoxications dues à la patisserie à la crème et au chocolat, au lait, au fromage, au pâté de poulet, au jambon, à la langue, au saucisson de foie et aux conserves de maquereaux à l'huile.

Lanson (60) signale lui aussi des infections intestinales dues au "staphylocoque" après ingestion de denrées polluées.

7. Conclusion

En 1907, à la suite de recherches effectuées chez le lapin, à l'institut Pasteur de Lille, Calmette et Petit (61) avaient établi que le "Staphylocoque" peut franchir la muqueuse de l'intestin grêle et du gros intestin et être décelé un mois après dans la moëlle.

Mais les intoxications "staphylococciques" ne furent réellement prises au sérieux qu'à partir de 1930 ; Dack et ses collaborateurs (62) isolèrent alors un "staphylocoque" doré hémolytique dont le filtrat de culture provoquait chez des volontaires humains des symptômes typiques d'intoxication.

Plus tard, Sewitt (63) estimait que 13,5 % des cas de diarrhée observés à Dublin en 1942-43 étaient dûs au "Staphylocoque".

En 1942, Scott estimait qu'avant 1940 environ un tiers des intoxications alimentaires, était dû au "staphylocoque" et Jensen déclarait en 1945, qu'aux Etats-Unis, 90 % des intoxications étaient réellement causées par ce germe.

En 1947, Gernez, Rieux, Buttiaux et Mlle Brogniart (64) ont fait une mise au point sur le rôle du "staphylocoque" dans les intoxications alimentaires et lui ont attribué la responsabilité d'un grand nombre de celles-ci.

Dack en 1949, reprenant les statistiques parues depuis 1830, a montré que les empoisonnements alimentaires par le "staphylocoque" constituaient en réalité une vieille calamité.

Conybeare (65) constata que sur 3270 cas d'intoxications alimentaires observés en dix ans en Angleterre, 20 % étaient dûs au "staphylocoque".

Milton Feig (66) a établi la liste des bactéries responsables aux U.S.A., de 1945 à 1947, de 926 foyers d'intoxications alimentaires avec 49 879 personnes atteintes ; il nota que les "staphylocoques" étaient responsables d'au moins les trois quarts des foyers, et que leur fréquence était quatre à cinq fois plus grande que celle des Salmonelles.

On connaît donc depuis longtemps les intoxications alimentaires par le "staphylocoque", mais c'est surtout depuis 1930, et particulièrement durant la dernière guerre mondiale que les bactériologistes américains d'abord, anglais ensuite et italiens enfin, signalèrent le rôle prépondérant joué par ce germe dans de nombreuses intoxications alimentaires.

Nous avons donc pu constater l'importance des intoxications alimentaires par le "staphylocoque" et l'intérêt que les hygiénistes y portent depuis quelques années ; en effet, si au début du siècle on considérait que 90 % de celles-ci étaient dûes ou attribuées aux Salmonelles, il n'en est plus de même actuellement, et c'est le "staphylocoque qui est suspecté et bien souvent imputé comme étant le responsable des intoxications alimentaires de plus en plus nombreuses chaque année.

II. ETIOLOGIE

Le "staphylocoque" est un germe très répandu, dans l'air, dans l'eau, dans le sol, à la surface de nos téguments, de nos muqueuses, et tous les aliments sont exposés à être souillés par lui. Fort heureusement tous les "staphylocoques" ne sont pas pathogènes, et tous les aliments ensemencés ne conviennent pas à la formation de produits toxiques. Dans ce qui va suivre, nous allons donc envisager quelles sont les origines des germes rencontrés dans les produits alimentaires souillés, ainsi que leurs conditions de multiplication optimale et de production de toxine.

1. Mode de contamination

Certains aliments peuvent, dès l'origine renfermer des "staphylocoques", l'animal producteur étant infecté. C'est ainsi que, examinant soixante échantillons de viande de boeufs abattus d'urgence, M. Asdrubali (67) a pu mettre en évidence des "staphylocoques" dans trente échantillons ; treize n'étaient pas pathogènes, dix-sept l'étaient, dont un entérotoxique.

Sur trente-huit souches de "staphylocoques" isolés de lait prélevé sur des vaches atteintes de mammite, et de lait de vaches apparemment saines, Minett a isolé dix-huit souches entérotoxiques.

Après Barber (6), Lanson rapporte une intoxication due à du lait provenant de vaches atteintes de mammite.

T. Rosati (68), examinant 90 échantillons de lait, a pu isoler 54 "staphylocoques" dont un entérotoxique et, dans 382 échantillons de lait, A. Ceccarelli et F. del Francia (69) ont mis en évidence deux "staphylocoques" entérotoxiques.

Il n'est pas douteux que les "staphylocoques" entérotoxiques sont assez fréquents dans le lait de vache et de chèvre, mais le mélange des laits qui dilue l'entérotoxine d'une part, la Pasteurisation et l'ébullition d'autre part, qui détruisent les "staphylocoques", sont les raisons pour lesquelles les intoxications causées par le lait et ses dérivés ne sont pas plus fréquentes.

Mais souvent la contamination est dûe au matériel, en effet sous l'influence des jus de viande, des matières grasses, le bois macéré devient un terrain de culture pour les bactéries et celles-ci ensemencent les viandes déposées ou travaillées sur ces tables.

Il suffit d'ailleurs pour se convaincre de cet état de fait, de parcourir l'historique pour se rendre compte que la plupart des intoxications alimentaires sont observées après l'ingestion de denrées ayant fait l'objet de manipulations et de traitements culinaires ; nous avons pu constater en effet que les produits contaminés primitivement chez l'animal (mammites, abattages d'urgence, affections chroniques ...) étaient l'exception.

Quant à cette contamination secondaire elle est en général dûe à des manipulateurs atteints d'infections "staphylococciques" ou porteurs sains de germes : cuisinier dont un doigt était infecté par le "staphylocoque", ouvrier porteur de furoncles ou d'infections rhino-pharyngées, cuisinier atteint d'orgelet, boucher présentant une pyodermite au visage ... La muqueuse pituitaire est un repaire fréquent de "staphylocoques" et leur dispersion dans le voisinage est facile à imaginer. Cette notion doit être retenue comme très importante, en effet elle explique le fait suivant en apparence paradoxal ; des intoxications collectives par les rillettes provenant de trois fabriques différentes ont été observées à la saison froide : n'est-ce pas parce que cette époque est celle où les infections rhino-pharyngées sont fréquentes et où les doigts des ouvriers risquent davantage d'être souillés par du mucus nasal ? Pendant les beaux jours, les sécrétions de cette muqueuse étant très peu abondantes, les risques d'une telle contamination sont beaucoup moins grands.

Quant à R. Richou et coll. (70), ils ont constaté le fait qu'aucun des "staphylocoques" isolés des produits alimentaires ayant provoqué des intoxications, ne possédait la toxine β - que seuls élaborent les "staphylocoques" d'origine animale - et que dix de ces vingt-deux germes possédaient un pouvoir fibrinolytique - qui appartient essentiellement aux souches humaines -. Ce caractère semblerait donc prouver que ces mêmes "staphylocoques" isolés de ces préparations de viande sont d'origine humaine.

Les auteurs concluent, et c'est là le reflet d'une doctrine générale, que les viandes contaminées par les "staphylocoques" le sont dans la majorité des cas par des manipulateurs porteurs de ceux-ci ou par du matériel souillé par ces manipulateurs.

2. Développement des germes - Production de toxine

Ce sont les produits manipulés les plus dangereux, car les conditions de conservation avant la consommation sont plus mauvaises, les produits examinés ont des caractères organoleptiques favorables, et tous les échantillons d'une même fabrication ne produisent pas d'intoxications, mais, si ceux-ci sont abandonnés à la température ordinaire durant quelques jours, ils provoqueront des intoxications. Donc, pour qu'il y ait accident, il faut un certain délai d'incubation qui permettrait la multiplication de ces "staphylocoques" et l'élaboration de la toxine.

C'est ainsi que Suzzi-Valli (71) et Mitrovic (72) ont montré que les intoxications dûes au thon ou au maquereau à l'huile ne frappent que ceux qui consomment les conserves plusieurs jours après l'ouverture des boîtes.

Barber a rapporté qu'un lait contaminé, consommé dès la sortie de la mamelle, ne causait aucun trouble, alors qu'après un séjour de cinq heures à trente degrés, il entrainait des troubles gastro-intestinaux typiques.

Lansön montra que des aliments contaminés par des "staphylocoques" et consommés cinq heures après leur préparation ne causèrent aucune intoxication, vingt-six heures après il y eut deux ou trois malades seulement, cinquante-quatre heures après, des symptômes typiques d'intoxication furent notés chez tous les sujets.

Quant à Nevot et coll. (44), ils ont rapporté une intoxication alimentaire à "staphylocoques" dûe à de la viande bouillie, ils y décelèrent de nombreux cocci, or celle-ci avait été cuite la veille et laissée dans le bouillon à la température de la cuisine jusqu'au lendemain ; ce même bouillon, était donc d'après eux, des plus favorables à la production de toxine "staphylococcique".

De nombreux auteurs pensent que les denrées riches en amidon seraient plus aptes à produire des intoxications que celles qui n'en contiennent pas.

A vrai dire, on n'est pas encore exactement fixé sur les conditions nécessaires à la multiplication des "staphylocoques" et à l'élaboration de l'entérotoxine. Contrairement à l'opinion de Dolman (73), Kelly et Dack (74), Jordan et Burrows (52), Stone (75), pensent que les "staphylocoques" n'ont pas besoin de conditions particulières de température et de substratum, sinon disent-ils, les intoxications alimentaires seraient beaucoup plus rares. Dans les expériences de Kelly et de Dack, sur des sandwiches au jambon et à la langue, les "staphylocoques" diffusèrent dans le pain à une profondeur de un centimètre après quelques heures à trente-sept degrés, alors qu'il fallait un jour pour qu'ils diffusent à la température ambiante ou à celle de la glace.

D'autre part Berarducci et Palazzetti (76) ont constaté que dans les poissons en conserve contaminés lors de la préparation industrielle, les "staphylocoques" ne sont pas en état de se multiplier tant que les boîtes restent fermées.

Ce qu'il faut retenir de cet ensemble de faits, c'est que les accidents sont d'autant plus graves qu'il s'est écoulé plus de temps entre la préparation et la consommation des aliments ; ce qui évoque l'idée de l'intervention d'une substance toxique élaborée par le "staphylocoque" durant son développement dans les aliments et expliquerait les intoxications alimentaires par des produits cuits au moment de leur consommation, en effet, l'entérotoxine étant thermostable, ne serait pas détruite.

Quant aux conditions optimales de développement des "staphylocoques", elles sont réalisées dans les viandes salées. En effet, à la teneur de cinq à dix pour mille, le sel est susceptible d'empêcher la multiplication de beaucoup de germes sporulés et non sporulés, mais il n'inhibe aucunement le développement du "staphylocoque". Il s'agit d'un microbe chlorurophile, ce qui explique sa présence possible dans les saumures, les salaisons et les produits de charcuterie. Il est classique d'ailleurs dans les recherches de laboratoire d'isoler le "staphylocoque" dans les milieux hypersalés, contenant jusqu'à 75 pour mille de chlorure de sodium et même cent pour mille.

3. Résistance du "staphylocoque" (77)

Dans le pus, à la glacière, le "staphylocoque" conserve sa vitalité pendant trois mois. Les cultures en bouillon restent vivantes à l'étuve pendant trois semaines, et pendant trois à quatre mois à la température du laboratoire.

A la glacière, sur gélose, sa vitalité persiste un an. En macération de viande gélatinée le "staphylocoque" se conserve aussi longtemps.

La plupart des souches de "staphylocoques" dorés sont détruites par chauffage d'une heure à 38° C., mais quelques souches peuvent résister à cette température et ne sont tuées qu'à 60° C. Les "staphylocoques" blancs et citrins sont tués à 60° C. ou à 62° C.

Des solutions antiseptiques, de sublimé à deux pour mille, d'aldéhyde formique à deux pour cent, d'eau oxygénée à un pour cent, détruisent les "staphylocoques" en quelques minutes, certains colorants ont une action bactéricide à faible dilution, la fuchsine à un pour dix-mille, le cristal violet à un pour vingt mille.

Les "staphylocoques" sont des germes extrêmement sensibles aux nouvelles thérapeutiques (sulfamides et antibiotiques ...), mais ils ont la fâcheuse propriété de devenir rapidement résistants ; serait-ce dû à une plus grande hétérogénéité des souches, permettant une meilleure sélection des résistants ?

4. Conclusion

En résumé, nous pouvons conclure que les contaminations des aliments peuvent être dûes à des "staphylocoques" animaux (mammites, abattages d'urgence ...), mais dans la plupart des cas, ces mêmes germes sont d'origine humaine. Ce sont les ouvriers atteints d'affections "staphylococciques" diverses qui contaminent les produits alimentaires et le matériel, et les manipulations successives multiplient par la suite les ensemencements. Notons ici l'importance de la propreté des tables de travail et du matériel qui risquent après une première contamination d'être une réserve de germes, même après un traitement stérilisateur du personnel.

III. SYMPTOMES

Ce sont ceux de toutes les intoxications alimentaires d'origine microbienne, autres que le botulisme. Ils se traduisent toujours par une grande intolérance digestive, vomissements plus ou moins abondants, diarrhée souvent profuse, pouvant être sanguinolente, accompagnés d'un état de choc plus ou moins accusé, suivis d'une asthénie plus ou moins prolongée, notons également les sialorrhées, les sueurs profuses et l'oligurie.

Les accidents d'apparence toxique, éveillant l'idée d'un empoisonnement d'ordre chimique, ont fait penser à des intoxications arsenicales, mercurielles, voire à un empoisonnement par de la strychnine.

Ils se terminent le plus souvent en quelques heures, le temps nécessaire semble-t-il à l'organisme pour se débarrasser par des évacuations digestives abondandes du poison ingéré. Les évacuations terminées, le malade est souvent très fatigué, mais il est guéri. Il n'a généralement pas de fièvre.

En ce qui concerne les intoxications par le "staphylocoque", tous les auteurs sont d'accord pour signaler une période d'incubation particulièrement courte, d'environ trois heures et une évolution rapide en quelques heures. Le syndrome type est toujours celui d'un empoisonnement, mais les symptômes peuvent varier d'un malade à un autre. Chez certains les douleurs abdominales sont très accusées, chez d'autres les signes accompagnant les troubles digestifs consistent en céphalées, crampes musculaires, sueurs, chute de la pression artérielle : il en est même qui peuvent présenter un véritable état syncopal. L'inégalité des individus devant l'agression est un fait qui ressort de toutes les observations. Malgré ce tableau sévère, le rétablissement se fait généralement très rapidement en un à trois jours. On peut dire que la guérison est quasi-constante, sauf chez les enfants en bas âge, chez lesquels des cas mortels ont été signalés.

En résumé, la symptômatologie classique de ces intoxications alimentaires dûes au "staphylocoque" est caractérisée par l'apparition rapide de troubles généraux graves, sans élévation thermique (ou clocher thermique durant une ou deux heures) et par leur disparition en vingt-quatre heures sauf chez les nourrissons où une suite grave, voire fatale, peut être redoutée.

IV. DIAGNOSTIC

La constatation des mêmes symptômes sur des personnes ayant partagé le même repas conduit le médecin à envisager immédiatement une intoxication alimentaire.

Les désordres gastro-intestinaux quasi exclusifs le conduisent à éliminer le botulisme et à ne retenir que les intoxications à Salmonella et à "staphylocoque".

1. Diagnostic clinique

Il n'y a pas à vrai dire de symptômes spécifiques pour les intoxications dûes au "staphylocoque", dependant nous retiendrons une atteinte gastro-intestinale avec douleur et diarrhée souvent profuse, survenant dans les quelques heures qui suivent l'ingestion des aliments et cessant dans les quarante-huit heures suivantes ; en effet une des caractéristiques des intoxications "staphylococciques" est son caractère bénin, seules celles observées chez les tout jeunes enfants pouvant avoir une issue fatale.

Dans les intoxications salmonelliques, le délai d'apparition est plus long (12 - 24 heures), l'état syncopal est rarement observé et l'élément infectieux y est net: fièvre élevée durant un jour au moins, souvent plus ; (pas de clocher thermique durant une à deux heures comme pour le "staphylocoque"). Ici la maladie est beaucoup plus longue et dure plusieurs jours.

Il convient de signaler certaines analogies entre l'action de l'entérotoxine "staphylococcique" et celle des toxines cholériques et dysentériques. Les crampes musculaires sont parfois très vives ; on a décrit dans le choléra une forme simulant l'angine de poitrine. J. Boyer, P. Mercier, J. Pillet et M. Tissier (78) ont en effet observé une forme pseudo-angineuse, jamais décrite à ce jour dans les intoxications à "staphylocoques".

2. Diagnostic expérimental

Les grandes lignes de celui-ci sont les suivantes :

a/ prélever les aliments suspects

b/ effectuer les manipulations dans des récipients stériles

c/ examiner au microscope les échantillons

d/ réaliser des dilutions décimales en série des échantillons , les cultiver sur gélose nutritive pour la numération totale de la flore microbienne et sur milieu hypersalé pour isoler les "staphylocoques".

e/ étudier le pouvoir pathogène de ces derniers avec les tests usuels.

Pour affirmer qu'une intoxication alimentaire est d'origine "staphylococcique" il faudra non seulement mettre en évidence des "staphylocoques", mais encore montrer que ces germes sont pathogènes.

D'après R. Buttiaux et Mossel (79) le nombre de germes au gramme ne doit pas dépasser 100 000. Si les chiffres obtenus pour la flore "staphylococcique" sont de beaucoup supérieurs à ce dernier, la recherche du pouvoir pathogène de ces même germes pourra permettre de conclure à une intoxication "staphylococcique".

Le diagnostic expérimental permet donc ainsi de définir la nature du contaminant, mais il pourra au besoin déterminer l'origine de ce dernier. Le moyen le plus sûr consistera en l'analyse systématique et simultanée de tous les éléments entrant dans la composition d'une fabrication, et d'y associer des prélèvements effectués aux divers stades de cette dernière, de l'étuvage et de la maturation consécutifs.

C'est ainsi que MM. Saurat (P.), Lautié (R.), Lescure (F.) (80 durent déterminer la nature et l'origine de la pollution microbienne de produits de charcuterie ayant provoqué une intoxication familiale dans le sud de la France en 1959. Un coccus était le germe responsable de celle-ci; pour déterminer son origine, tous les produits constitutifs de la saucisse furent analysés, aucun d'entre eux ne renfermant le germe incriminé, à l'exception d'un seul, le liant qui contenait 700 000 germes au gramme. La multiplication microbienne était très importante durant la prépa-

tion de cette saucisse et cette dernière contenait plusieurs millions de cocci au gramme au moment de la consommation.

- Un point particulier, propre au diagnostic différentiel mérite d'être discuté. On s'accorde unanimement pour reconnaître la valeur des coprocultures dans la recherche des Salmonelles, en est-il de même pour les "staphylocoques" ?

Il est bon de noter à ce sujet que, parmi les auteurs, l'unanimité n'est pas faite.

Felsen (81) admet que l'on peut déceler des "staphylocoques" dorés dans les selles (comme flore pure ou dominante), pour lui, le fait de les déceler en pleine évolution de l'affection, conjointement avec leur disparition au moment de l'entrée en convalescence, paraît assez probant du point de vue de la signification étiologique.

MM. R. Turpin, J. Pillet et Mme (82) ont étudié 200 souches de "staphylocoques" prélevés au niveau des fosses nasales antérieures, du pharynx et de la muqueuse ano-rectale sur trente et un nourrissons. 140 souches étaient pathogènes dont 123 était typables par la sérologie et 117 par les phages.

M. Cathala (83) fait observer qu'un "staphylocoque" prélevé sur un nourrisson atteint d'une toxi-infection peut être pathogène sans qu'on puisse en déduire qu'il est responsable de celle-ci.

Minck et coll. (84) décèlent des "staphylocoques" entérotoxiques, même en l'absence de symptômes digestifs, dans les selles d'enfants hospitalisés.

Nous concluerons en signalant que les Ecoles américaines et canadiennes n'attribuent en général pas de valeur à ce test, tandis que les Ecoles anglaises et françaises (R. Buttiaux) y attribuent une réelle valeur .

V. PATHOGENIE

Les accidents observés sont-ils une infection ou une intoxication ?

D'après Marnier et Martin les deux éventualités sont possibles. Chez le nourrisson et le jeune enfant il s'agirait d'une infection gastro-intestinale, alors que chez l'adulte, le "staphylocoque" provoquerait une intoxication. L'entérotoxine pour ces derniers n'aurait pas une action locale directe sur le tube digestif, mais atteindrait le système nerveux périphérique.

D'après Névot (85), la pathogénie des intoxications alimentaires à "staphylocoque" est expliquée par l'action d'une entérotoxine sécrétée par le microcoque. Le "staphylocoque" est un germe producteur de nombreux poisons qui ont été successivement étudiés par Arloing et Gourmont (1891 - 1892), J. Denys et Van De Velde (1895), Nicolle et Césari (1914), Burnet (1929), Nelis (1930), Ramon, Debré et Thieffry (1930-1937). De filtrats de culture de certains "staphylocoques" entretenus en milieux spéciaux, il a été isolé des toxines qui peuvent avoir :

1/ une action hémolytique sur les globules rouges de nombreux animaux
2/ une action nécrotique par injection intradermique chez le lapin
3/ une action létale par voie veineuse et par voie sous-occipitale chez le lapin
4/ une action toxique sur les globules blancs (leucocidine de Van De Velde).

En outre, le "staphylocoque" élaborerait un principe particulier, une entérotoxine de classement difficile ; celle-ci différente des toxines hémolytiques, dermonécrotiques, létales, leucocidiques, du fait qu'elle n'est pas détruite à 100° C. durant trente minutes.

Ainsi que l'ont souligné P. Mercier et coll. (86), l'entérotoxine n'apparaîtrait pas comme une vraie toxine, mais elle se rapprocherait singulièrement du poison convulsivant, thermostable de la toxine botulinique D, récemment étudiée par Prévot et Brygao. Il s'agirait pour certains,

de produits de désintégration de matières protéiques, nées du métabolisme bactérien, expliquant vraisemblablement nombre d'intoxications dûes à des germes autres que le Clostridium botulinum et les Salmonella (85) ; tout microbe protéolytique paraît susceptible, quand il se multiplie sur un substrat convenable, de les produire et de donner naissance à des troubles. Le fait que certains filtrats microbiens et en particulier ceux du Proteus - germes qui, à diverses reprises, ont été isolés d'aliments responsables d'intoxications alimentaires - renferment des diastases extrêmement actives (87) dont l'action peut s'exercer, bien que réduite, à des températures très inférieures à 37° C., vient à l'appui de cette hypothèse.

VI. PROPHYLAXIE

L'entérotoxine "staphylococcique" est thermostable, il faudra donc éviter que le "staphylocoque", une fois présent se multiplie et soit en mesure de l'élaborer. Le résultat sera obtenu grâce à une coopération étroite entre le médecin et le vétérinaire.

- L'action du médecin doit porter surtout sur la surveillance sanitaire du personnel attaché à la préparation des aliments. L'hygiène du personnel devra être très sévère, et, toute affection "staphylococcique" cutanée, rhinopharyngée... devra être traitée ; l'ouvrier ne reprendra le travail qu'après stérilisation complète de l'affection.

- Celle du vétérinaire sera de surveiller l'hygiène des produits d'origine animale.

Il est bon de rappeler ici que ce sont surtout les produits conservés qui sont responsables de ce type d'intoxication. La surveillance du vétérinaire s'exercera donc sur les établissements industriels. Il s'agit ici, du contrôle de la pureté des produits employés, de la propreté des machines, des récipients, et des systèmes de maturation, de cuisson, de stérilisation, enfin, sur la bonne conservation du produit travaillé jusqu'à la consommation.

Notons cependant que la prévention des pollutions microbiennes réside essentiellement dans la propreté du matériel, tout particulièrement des tables sur lesquelles est effectué le triturage des viandes. Les tables de bois seront par exemple, avantageusement remplacées par des tables à revêtement imperméable. En effet, les bois macérés avec le jus de viande deviennent d'excellents terrains d'ensemencement microbien. Il est bon de constater que les diverses expériences tentées chez des commerçants producteurs de rillettes et d'autres produits manipulés se sont soldées par des résultats nettement positifs.

En résumé, d'après Wilson (88), Eyer (89) R. Buttiaux, A. Breton et B. Gaudier (90), les mesures essentielles et indispensables pour protéger la santé publique porteront sur :

1) La qualité des matières premières et ingrédients utilisés qui a une influence capitale sur celle du produit fini ; malpropres, ces substances sont non seulement dangereuses par elles-mêmes, mais causent des infections du matériel de l'usine, infections qui peuvent devenir permanentes, et, contaminer pendant de longues périodes l'ensemble des produits fabriqués.

2) La surveillance de l'installation des locaux, élimination des résidus, protection contre les rongeurs et insectes, ventilation, éclairage, propreté du sol, des murs, et la propreté "bactériologique" des tables de travail, ustensiles, hachoirs mécaniques, mélangeurs ...

3) Les manipulations qui seront effectuées en respectant de strictes conditions d'hygiène générale : propreté des mains, ongles courts et impeccables, propreté des vêtements de travail. Enfin on évitera dans toute la mesure du possible, le séjour dans les ateliers de fabrication de porteurs de germes pathogènes. Malgré un accord unanime, rien ou presque n'a été fait pour les éliminer. Les lois internationales les tolèrent pour des raisons de liberté individuelle, que l'on s'explique mal en l'occurrence.

Cependant la seule façon d'estimer les résultats effectifs de cette surveillance est de soumettre les substances alimentaires fabriquées à une analyse bactériologique appropriée. Elle aura d'autres avantages : la qualité du produit ainsi définie, sera pour l'industriel un encouragement à persévérer ou à mieux faire encore ; elle déterminera une salutaire émulation parmi la concurrence ; elle prouvera l'utilité des mesures préconisées aux autorités responsables ; elle permettra enfin de mettre sur un même plan les produits nationaux et ceux qui sont importés. Tous ces bénéfices du contrôle bactériologique systématique des aliments ont été démontrés par Thatcher (91). Il est impossible d'estimer la valeur hygiénique d'un aliment sans adopter des normes ou "standards". Cette question difficile reste discutée et seules des études entreprises sur le plan international pourront la régler. Les spécialistes groupés depuis 1953 dans le bureau permanent de la section de microbiologie et hygiène des aliments de l'association internationale des sociétés de microbiologie, affiliée à l'O.M.S., sont particulièrement

compétents pour les effectuer. La chimie a mis au point depuis le début du siècle des normes et des méthodes d'analyse rigoureusement standardisées. La bactériologie fait les mêmes efforts, mais la tâche est plus ardue et se heurte à plusieurs difficultés qu'il nous suffira de résumer (92) :

1) Les dénombrements de bactéries effectuées à partir d'une culture pure, dans les meilleures conditions et dans un même laboratoire, fournissent des résultats différents; le taux de variation peut atteindre 30 %.

2) Le phénomène se complique lorsqu'il s'agit d'évaluer le nombre de germes présents dans un aliment. Ceux-ci sont irrégulièrement distribués dans les portions en phase solide ou liquide, dans les protéines et lipides ... A l'intérieur même d'une de ces portions, la répartition est peu homogène. Le broyage manuel ou l'homogénéisation mécanique peuvent être insuffisants ou excessifs. Dans le premier cas, les pertes sont sensibles, dans le second la dissociation est susceptible de fragmenter les cellules constituant les chaînes ou amas de "staphylocoques" et d'entraîner ainsi des résultats trop péjoratifs.

3) Les températures d'incubation des milieux inoculés en vue du dénombrement des microbes des aliments ont une influence sur les résultats (93). Il en est de même de la durée de cette incubation, surtout dans les cas de milieux sélectifs (94 - 95). Là encore une harmonie s'impose dans les différents laboratoires.

- En conclusion, pour terminer ce chapitre sur la prophylaxie nous ferons remarquer qu'une propagande bien conduite pourrait être fort utile. Il serait bon d'exposer, sous une forme compréhensible pour les industriels, ces principes d'hygiène et de bactériologie appliquée. Ce "Code" sera rédigé par des Hygiénistes en collaboration étroite avec des techniciens des industries alimentaires. Un excellent exemple nous en est donné par celui existant en Afrique du Sud (96). On devra également faire une propagande auprès des médecins et des vétérinaires pour tout ce qui concerne les problèmes sanitaires, auprès de tous les détaillants pour faire respecter les règles d'hygiène et de conservation de ces produits et parmi les consommateurs pour leur apprendre les modalités de conservation domestique.

CHAPITRE II

L'AGENT RESPONSABLE : LE " STAPHYLOCOQUE "

Etude particulière des procédés de caractérisation des "staphylocoques" pathogènes.

I - CLASSIFICATION

Nous ne ferons pas une étude de systématique bactérienne, en effet celle-ci serait beaucoup trop longue, et, n'aurait pas un grand intérêt à être exposée ici ; nous nous attacherons plus spécialement à une étude adaptée à la compréhension de la troisième partie de notre travail.

Ayant commencé nos examens de saucisses en 1957, nous avions pris comme base, la classification du "Bergey's Manual" (97), édition de 1948 ; dans celle-ci le genre "Staphylococcus" n'existe pas, il est en effet intégré à celui des "Micrococcus", à l'inverse de ce qui se passe dans l'édition de 1958 du même "Bergey's Manual". Nous allons en rappeler les principaux points ; ce genre fait partie de la famille des Micrococcaceae, qui a les caractères généraux suivants :

- Les germes sont sphériques ; durant leur division, ils deviennent parfois elliptiques ; ils se présentent en paires, tétrades, paquets, masses irrégulières et même en chaînes ; ils sont rarement mobiles, ils sont Gram +, mais quelques espèces saprophytes peuvent se décolorer si rapidement qu'elles sont parfois considérées comme des Gram - ; la plupart des espèces pousse très bien sur des milieux ordinaires et est capable de pousser lentement en milieu anaérobie ; elle ne produit pas de gaz lors de la fermentation des hydrates de carbone, seules les espèces anaérobies en produisent.

Quant aux localisations naturelles des différentes espèces de cette famille, elles sont très variables, et on les rencontre aussi bien dans l'eau, l'air et le sol, que

sur la peau ou dans les glandes des êtres vivants.

Le critère de différenciation des trois genres principaux de cette famille est basé sur la disposition des colonies dans les milieux de culture.

a) *Genre Micrococcus* :

Les cocci sont isolés ou groupés en paquets irréguliers, mais jamais en chaînes. Ils peuvent présenter ou non un pigment jaune ou orange.

b) *Genre Gaffkya* :

Ici, nous constatons la présence de nombreuses tétrades, avec souvent une capsule quand les cultures sont effectuées sur des milieux spéciaux ; cependant sur un milieu de culture ordinaire, les cellules se groupent en paires ou en masses irrégulières, mais ne produisent jamais de pigment.

c) *Genre Sarcina* :

Les cocci sont toujours groupés en paquets réguliers, quant à la production de pigment elle varie avec l'espèce.

- Nous allons maintenant envisager les caractères et les propriétés de "Micrococcus pyogenes" qui renferme les cocci considérés comme pathogènes. Cette espèce appartient aux représentants du genre "Micrococcus" qui ont pour caractéristiques principales :

Ce sont des germes aérobies ou anaérobies facultatifs, donnant des colonies circulaires lisses, colorées ou non sur le milieu gélosé, fermentant le mannitol, liquéfiant la gélatine, réduisant les nitrates en nitrites et n'ayant pas la propriété d'utiliser le phosphate d'ammonium comme seule source d'azote ; certaines de ces souches ont en plus le pouvoir - dans des conditions favorables - de produire des exotoxines, mais aussi de l'entérotoxine (98) laquelle est souvent la cause d'empoisonnements alimentaires.

Quant à la différenciation des souches de cette espèce, elle s'effectue en fonction de la pigmentation, mais tous les autres caractères culturaux, biochimiques et pathogènes sont identiques.

Nous distinguerons donc :

1/ "Micrococcus pyogenes aureus"
2/ "Micrococcus pyogenes albus"
3/ "Micrococcus citreus"

II - MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR PATHOGENE D'UN "STAPHYLOCOQUE"

L'isolement d'un "staphylocoque" pose deux problèmes : le germe est-il pathogène et peut-on déterminer l'origine et la spécificité de ce microbe ? Dans ce qui va suivre, nous étudierons successivement les techniques couramment utilisées pour répondre à ces questions.

Celles-ci peuvent être appliquées soit in vitro soit in vivo, selon les principes directeurs différents avec les cas envisagés.

1. Tests indirects du pouvoir pathogène in vitro

Ils comprennent la recherche des propriétés biochimiques et biologiques qui, habituellement vont de pair avec le pouvoir pathogène.

Nous envisagerons successivement :

a/ La chromogénèse
b/ Les propriétés biochimiques
c/ La toxicogénèse in vitro

a) *CHROMOGENESE*

Nous étudierons les deux aspects de la pigmentation : production naturelle et production artificielle.

1/ *Production naturelle de pigment*

C'est celle qui est observée sur une colonie après culture sur gélose ordinaire pendant 48 heures à l'étuve à 37° C.

aa/ Nature de la pigmentation

Celle-ci est dûe à un pigment caroténoïde ordinairement jaune ou citrin, produit par le "staphylocoque", mais tous les degrés de pigmentation ont été observés depuis l'orange foncé jusqu'à l'absence de pigment en passant par le doré et le citrin.

bb/ Etude systématique de la pigmentation

De nombreux germes des genres Micrococcus et Sarcina produisent des pigments, mais le caractère n'est pas cons-

tant, la production de celui-ci semble en effet liée à des conditions de culture bien précises. Ainsi Lubinsky a montré que pour une même souche, le pigment variait avec l'âge de la culture et avec la quantité d'oxygène offerte à la bactérie. D'après cet auteur, le pigment doré disparaîtrait avec le passage répété chez l'animal et avec la culture en aérobiose.

Les travaux récents de Nahour montrent d'ailleurs que l'on obtient, à partir d'une cellule considérée comme productrice de pigmentation, un certain nombre de colonies filles ne sécrétant pas les caroténoïdes. Les variantes blanches obtenues présentent cependant tous les autres caractères biologiques de la souche dont elles proviennent.

Barber a obtenu des "staphylocoques" dorés à partir de souches blanches cultivées en présence de chloroforme.

Kourilsky et Mercier ont réussi expérimentalement à faire virer une souche blanche en souche dorée, quant aux raisons de ce virage, les auteurs supposent qu'il est subordonné à des conditions de culture, aérobiose, qualité du milieu... Nous-mêmes d'ailleurs avons pu constater plusieurs fois l'apparition de colonies colorées au sein d'une culture achromogène.

Nous constatons donc ici que ce caractère est sujet à fluctuation et soumis aux contingences de l'environnement ; le problème se pose maintenant de savoir si un "staphylocoque" pathogène est dans la plupart des cas producteur de pigment.

cc/ Relation entre le pouvoir pathogène et la pigmentation

De nombreux "staphylocoques", comme nous l'avons dit plus haut, produisent du pigment, cependant seul "Micrococcus pyogenes aureus" parmi ceux-ci présente un caractère pathogène. Cette espèce étant souvent incriminée dans les intoxications alimentaires, la présence d'un "staphylocoque" pigmenté dans une denrée alimentaire, constituerait donc un élément de suspicion de grande importance.

Kolle et Otto, Lubinsky et Winslow , Mercier et ses collaborateurs ont montré que les souches blanches peuvent être pathogènes au même titre que les dorées ; à tel point que de nombreuses souches de "Micrococcus pyogenes albus" peuvent élaborer la coagulase et les hémolysines, propriétés considérées comme quasi spécifiques des "staphylocoques" pathogènes.

Kourilsky et Mercier ont étudié en particulier le rapport qui existe entre la pigmentation du "staphylocoque" et son pouvoir pathogène titré "in vivo" chez le lapin.Sur 35 souches humaines examinées, 23 étaient blanches et 12 colorées. Le titrage du pouvoir pathogène de ces douze "staphylocoques" dorés s'est toujours révélé positif ; par contre, sur les 23 souches blanches, 4 étaient douées de pouvoir pathogène élevé. Les auteurs déclarent même avoir trouvé un "staphylocoque" blanc particulièrement virulent dans un cas de septicémie "staphylococcique" chez l'homme.

La pigmentation d'une souche de "staphylocoques" n'est donc pas un caractère valable pour affirmer que ce germe est doué ou non de pouvoir pathogène.

Autrefois, on attribuait une grosse valeur à ce caractère, actuellement on considère celle-ci comme contingente, pour ne pas dire nulle et on étudie la production de pigment par tradition, elle n'offre en effet pas d'autre intérêt.

2/ Production artificielle de pigment

- Milieu au cristal violet

On utilise une gélose hypersalée (ClNa 75 g./l.) contenant de 1/300 000 à 1/400 000 de cristal violet. Après 24 heures d'étuve, les souches saprophytes restent blanches et les pathogènes prennent une teinte violette, ou bien, si elles sont dorées, elles présentent à la périphérie une auréole violette.

Ce sont Chapman et Bereus (99) qui ont proposé en 1935 de différencier les "staphylocoques" pathogènes de ceux dits saprophytes par la réaction du cristal violet.

Mais cette méthode n'a pas donné depuis de grandes satisfactions (100), en effet, ce test apparaît pratiquement sans valeur pour les "staphylocoques" d'origine humaine, car la majorité de ceux-ci ne possèdent pas la propriété de fixer le colorant : par contre ce test a une valeur supérieure pour les "staphylocoques" d'origine animale, où 80 % des souches pathogènes répondent positivement (101). Nous constatons donc que même pour les "Staphylocoques" d'origine animale la méthode n'est pas parfaite. Elle est en général abandonnée actuellement car elle entraîne de nombreuses erreurs.

b) *PROPRIETES BIOCHIMIQUES*

Certaines semblent présenter une relation intéressante avec l'existence du pouvoir pathogène ; on recherche donc celles-là pour conclure à l'existence de celui-ci ; mais ce n'est là qu'une extrapolation, sans qu'il n'y ait jamais de relation de cause à effet entre la réaction biochimique déterminée et le pouvoir pathogène.

1/ *Utilisation du mannitol en milieu de Chapman*

L'aptitude de nombreuses souches de "staphylocoques" à faire fermenter certains sucres a été démontrée depuis longtemps ; mais ce germe faisant fermenter un grand nombre de substances ternaires, il a été délicat de trouver la réaction fermentaire la plus intéressante. De nombreuses recherches, il paraît résulter que la propriété la plus constante des cocci pathogènes était la fermentation du mannitol.

Elle se recherche habituellement sur milieu de Chapman, qui est en même temps un milieu d'isolement et un milieu diagnostic ; mais on pourrait tout aussi bien rechercher l'utilisation de ce polyalcool en tube d'eau peptonée.

Le milieu de Chapman est hypersalé (75 g./l.) ; il contient de plus du mannitol à 0,2 % et du rouge de phénol comme indicateur de pH. ; le pH est ajusté à 7,4 ; la fermentation du mannitol se manifeste par une acidification du milieu. La lecture en boîte de Pétri s'effectuera après 48 heures d'étuve à 37° C. Certaines colonies seront grosses et entourées d'une auréole jaune dûe à la fermentation du mannitol. D'autres colonies seront petites et ne présenteront pas l'auréole du virage. Les premières seront considérées comme des souches pathogènes alors que les autres ne le seront pas.

Kourilsky, Mercier et Pillet ont montré l'existence de rapports entre l'utilisation du mannitol par un "staphylocoque" et le pouvoir dermonécrotique vis-à-vis du lapin. Un germe ne fermentant pas ce polyalcool, n'est le plus souvent doué que d'un équipement enzymatique limité et, par extension, d'une virulence faible. Cette correspondance semble cependant moins marquée pour les germes isolés des animaux, où 70 % des "staphylocoques" pathogènes seulement sont susceptibles de fermenter le mannitol en 24 - 48 heures.

2/ *Coagulation du plasma oxalaté*

La coagulase est un enzyme du "staphylocoque" qui coagule le plasma humain ou celui du lapin.

Après isolement sur milieu de Chapman, on ensemence sur bouillon nutritif une colonie ayant fermenté le mannitol, et on laisse à l'étuve à 37° C. durant 12 - 18 heures.

Le plasma, étant commercialement fourni sous forme lyophilisée, au moment de l'emploi, on ajoute à l'ampoule 1,5 cc d'eau distillée exactement mesurés, on laisse dissoudre puis on agite pour homogénéiser la solution.

On mesure dans un tube à hémolyse 0,5 cc de la dilution du plasma normal témoin et 0,5 cc du bouillon de culture du "staphylocoque" à tester. On agite et on porte les tubes à l'étuve à 37° C.

Pour faire la lecture de la réaction, les tubes seront examinés toutes les demi-heures. La coagulation devra apparaître dans un temps inférieur à trois heures pour que la réaction soit positive. En général, la prise en masse du plasma est totale et le caillot adhère aux parois du tube. Dans quelques cas, il se forme un voile de fibrine moins consistant dont il sera tout de même tenu compte s'il apparaît en moins de trois heures.

Pour opérer plus rapidement on peut se contenter d'un essai sur lame ; il met en évidence le "clumping factor" étudié par Duthié (102) et qui a la même signification que la coagulase libre décelée en tube.

Selon Kourilsky et Ricou, le pouvoir coagulant d'un tel germe va de pair avec son pouvoir pathogène.

R. Buttiaux (103) de l'Institut Pasteur de Lille partage cette opinion.

Le test de la coagulase est donc très important et doit être considéré comme un bon signe du pouvoir pathogène d'un "staphylocoque".

3/ *Fibrinolyse*

Certains "staphylocoques" peuvent métaboliser la fibrine de l'homme ou du lapin.

La fibrine est préparée en chauffant du plasma à 56° C. pendant huit minutes, on recueille ensuite le précipité et on y ajoute une partie d'eau physiologique. On verse un cc du mélange dans une boîte de Pétri, puis de la gélose fondue maintenue à 50° C., on incline et on redresse la boîte

pour répartir le précipité dans toute la masse liquide. La gélose solidifiée qui contient de nombreux précipités, est ensemencée avec une anse de Platine pour obtenir une seule colonie.

Après 24 heures d'étuve, la colonie lysant la fibrine est entourée d'un cercle de gélose claire, dépourvue de précipité.

R.R. Madison (104) a utilisé le caillot de plasma humain débarrassé de sérum pour mesurer le pouvoir fibrinolytique de 145 souches de "staphylocoques" de différentes origines. Il trouve que pour les souches isolées de lésions superficielles humaines (acné, furoncles, etc...) 77 % ne manifestent aucune propriété fibrinolytique. Par contre, parmi les souches isolées de lésions des organes internes (septicémie, ostéomyélite, empyème) 90 % se montrent fibrinolytiques dont 37 % très actives. En outre, aucune des 24 souches, isolées des animaux ne s'avèra capable de liquéfier la fibrine humaine.

Cette opinion est partagée par de nombreux auteurs qui estiment que l'action sur la fibrine coagulée est très fidèle pour les "staphylocoques" isolés de l'homme, l'absence de fibrinolysine chez un "staphylocoque" pathogène devant faire présumer de son origine animale.

Pour R. Richou (105), il y aurait un rapport étroit entre les diastases protéolytiques telles que la fibrinolysine, et la coagulase ; ces deux enzymes allant généralement de pair chez les "staphylocoques".

En résumé, la présence de fibrinolysine constituera un test fidèle de virulence, mais pour les "staphylocoques" d'origine humaine seulement.

4/ Gélatinolyse

On sait depuis longtemps que certaines souches de "staphylocoques" secrètent une protéinase qui liquéfie la gélatine. Cette action, maximum à + 45° C. en présence de 20 % de CO_2, se manifeste encore à + 18° et est abolie à + 4°.

La méthode directe est la plus couramment employée, elle consiste à ensemencer le "staphylocoque" en gélatine. A partir du deuxième au dixième jour, on note une liquéfaction en forme d'entonnoir, d'importance variable.

La technique de Stone nous permet de rechercher le test de liquéfaction de la gélatine plus rapidement. Il faut couler le milieu de Stone en boîte de Pétri la veille de l'ensemencement. On effectue celui-ci en faisant quelques dépôts (car le milieu est mou) ; on place les boîtes de Pétri à l'étuve à 37° C durant 24 heures ; on verse alors 4 - 5 cc de solution saturée de sulfate d'ammonium, en deux à trois minutes, la surface du milieu va s'opacifier, les colonies à "réaction de Stone" positive, s'entourent d'une auréole transparente.

Le test de Stone peut également être recherché sur le "Bacto Stone Médium N° 110, Difco" ; la méthode est la même mais la solution saturée de sulfate d'ammonium doit rester 10 minutes en contact avec les colonies. L'avantage réside ici dans le fait que l'on peut pratiquer la recherche de ce test sans avoir repiqué les colonies, ce milieu étant en effet sélectif pour les "staphylocoques".

Environ 80 % des "Staphylocoques" dorés et 50 % des blancs, et beaucoup de citrins, possèderaient cette propriété qui pourrait disparaître à la longue.

Pour A. Névot, J. Pantaléon et R. Rosset (107), la liquéfaction rapide de la gélatine serait une propriété qui appartiendrait dans la majorité des cas aux "staphylocoques" entérotoxiques.

De même pour Stone, toute colonie donnant une réaction positive à son test doit être considérée comme entérotoxique ; mais Chapman, Lieb et Curcio ne lui attribuent qu'une valeur relative.

Quant à Schwarz (108) il a constaté que quelques "staphylocoques" sans action sur la gélatine n'en étaient pas moins toxinigènes.

Saski et Feygin indiquent qu'il n'y a pas de concordance entre le pouvoir protéolytique des "staphylocoques", en particulier celui de liquéfier la gélatine, et leur pouvoir toxinigène.

En résumé, on ne pourra donc pas se fonder sur cette gélatinolyse pour créditer une souche du pouvoir pathogène.

c) *TOXICOGENESE IN VITRO : HEMOLYSINES*

Il existe plusieurs sortes d'hémolysines chez le "staphylocoque", nous ne parlerons ici que des hémolysines α et β.

La technique de production consiste à piquer une colonie sur gélose au sang contenant deux pour cent de sang de mouton. Il faut incuber à 37° C pendant 48 heures en atmosphère contenant 30 % de CO_2, nous observerons alors :

- un milieu inchangé ..... pas d'hémolysine
- une zone limpide et nette autour de la colonie..
  ..... hémolysine α
- une zone incomplètement clarifiée .....
  ..... hémolysine β

L'hémolysine α caractérise les "staphylocoques" d'origine humaine, l'hémolysine β ceux d'origine bovine.

En cas d'hémolyse β, mettre la boîte de Pétri au réfrigérateur à + 4° C. pendant douze heures ; la zone d'hémolyse incomplète devient franchement claire.

Mais, contrairement aux notions orthodoxes précédentes, les "staphylocoques" produisent souvent une hémolyse à la fois α et β (petite zone claire entourée d'une zone incomplètement clarifiée), dont les relations ont été bien étudiées par R. Richou (109).

Les hémolysines sont thermolabiles, elles sont détruites à 100° C. Ce caractère les différencie de l'entérotoxine qui est thermostable et résiste à 100° C. durant 30 minutes. Notons ici que R. Richou, J. Pantaléon, J. Billon et M. Cazaillet (70) ont constaté que deux filtrats de culture "staphylococcique" avaient conservé leur pouvoir hémolytique vis-à-vis des globules rouges du lapin après un chauffage de trente minutes à 100° C.

Les mêmes auteurs (110) après de nombreuses expériences ont constaté que ce sont les souches isolées de denrées comme étant à l'origine d'intoxications alimentaires, qui élaborent les toxines hémolytiques α les plus actives. Il apparaîtrait donc que la production d'une substance douée d'un pouvoir entérotoxique soit le privilège des "staphylocoques" qui montrent parallèlement une forte aptitude à l'élaboration de cette toxine hémolytique α.

Presque tous les auteurs s'accordent pour donner une grande importance à ce test. En effet tous les "staphylocoques" pathogènes sont hémolytiques bien que de non pathogènes le soient parfois.

2. Tests directs du pouvoir pathogène in vivo

D'une façon classique le chat et le lapin sont utilisés comme animaux d'épreuve ; mais des travaux récents ont permis de montrer que la souris, le grenouille, le singe, l'embryon de poulet, pouvaient être utilisés commodément pour mettre en évidence le pouvoir pathogène des "staphylocoques".

Nous envisagerons ici uniquement l'étude du pouvoir dermonécrotique sur le lapin et la mise en évidence de l'entérotoxine "staphylococcique", celle-ci étant directement applicable à la caractérisation des "staphylocoques" responsables d'intoxications alimentaires.

a) *POUVOIR DERMONECROTIQUE SUR LE LAPIN*

La technique de recherche de ce test sera la suivante :

- employer la culture de 24 heures à 37° C sur gélose inclinée
- émulsionner le produit de raclage du milieu dans environ 10 cc de soluté physiologique stérile pour obtenir une émulsion mère ; préparer à partir de cette émulsion des dilutions de 1/100 à 1/2 000.
- La veille de l'épreuve, épiler un lapin au moyen d'une solution de sulfure de Baryum au niveau du flanc.
- Le jour de l'inoculation, pratiquer des injections intra-dermiques avec 1 cc de chaque dilution, en des endroits différents, nettement séparés les uns des autres (d'habitude on emploie 4 dilutions).
- Commencer l'observation de l'animal 24 heures après les injections ; on remarque au niveau du point d'inoculation de la dilution la plus concentrée une auréole inflammatoire qui s'étale les jours suivants ; les lésions s'infiltrent d'oedème et s'escharrifient ; les dilutions plus faibles produisent des phénomènes en rapport avec leurs taux ; dans ce cas on concluera à l'existence d'un "staphylocoque" pathogène, les cocci saprophytes ne produisant pas ces symptômes.

On a également montré qu'il y avait une relation assez étroite entre le pouvoir pathogène du "staphylocoque" pour le lapin et la présence d'hémolysine α.

b) *MISE EN EVIDENCE DE L'ENTEROTOXINE*

1/ *Production*

Pour obtenir un filtrat, on ensemence un bouillon de culture à étudier en surface et en profondeur sur trois boîtes de Pétri, dans lesquelles est coulé un milieu semi-solide de Dolman.

On incube à 32° C. en atmosphère contenant 30 % de CO_2, au bout de 3 - 4 jours, on filtre sur Seitz et on recueille le filtrat ; celui-ci contient toutes les toxines, l'entérotoxine étant seule thermostable, on isole en portant le filtrat à l'ébullition durant quelques minutes.

2/ *Propriétés de l'entérotoxine*

La spécificité de l'entérotoxine paraît parfaitement démontrée depuis les recherches de Dolman (111), qui a étudié une souche de "staphylocoques" élaborant de l'entérotoxine sans hémolyse α et β.

Jordan et Dack ont également montré que certaines souches de "staphylocoques" élaborent une entérotoxine responsable de troubles gastro-intestinaux de l'homme.

L'entérotoxine diffère des toxines hémolytiques, dermonécrotiques et létales par sa grande résistance à la chaleur. Elle n'est qu'atténuée après chauffage d'une demi-heure à 100° C. d'après Dack, Cay et Woolpert (112) ; elle peut donc résister à la cuisson, ceci pour Caudill et Humphrey (113), O.C. Woolpert et G.M. Dack (114). Après chauffage à l'ébullition pendant trente et même quarante minutes elle se montre encore active chez le singe et le chat (Surgalla et Hitte) (115). Le filtrat bouilli donné à des volontaires humains (Jordan, Dack et Woolpert) (116), injecté dans la veine de singes (Davidson, Dack et Cary) (117) ou dans le péritoine de jeunes chats (Dolman et Minett) (118), cause encore des symptômes typiques. La toxine garde son pouvoir entérotoxique après traitement par l'alcool, alors que la toxine létale est détruite (Davidson et Dack) (119).

3/ *Expérimentation par ingestion*

La seule façon indiscutable de savoir si le filtrat contient une entérotoxine, c'est de la faire ingérer à des volontaires humains.

Les premiers essais sont dûs à Dack (120) qui faisant absorber à des volontaires humains des filtrats de culture de "staphylocoques" entérotoxiques, provoque chez eux les symptômes de l'empoisonnement alimentaire classique (121) ces résultats furent confirmés par Jordan et Coll. (122) Corpening et Foxhall (123), Crabtree et Litterer (124).

Les mêmes expériences furent effectuées sur le singe.

En 1932, Jordan et Brown (125) constatèrent de la diarrhée, une perte d'appétit, des douleurs abdominales, chez 5 animaux, sur treize, après l'ingestion de 50 cc. de filtrat de culture.

Borthwick (126) explique les différences dans le comportement des animaux par des différences de pH : la toxicité serait très diminuée à un pH supérieur à 7,8 ou inférieur à 6,8.

Des résultats positifs furent également obtenus chez le singe, par Woolpert et Dack (127) et par Hunter et Dack(128).

Le singe semblerait donc un peu moins sensible, mais les auteurs ont en plus constaté qu'il s'immunisait à la première ingestion, ce qui est évidemment un inconvénient majeur.

Quant au cobaye, au lapin et au chat (129), ils apparaissent comme de mauvais réactifs pour ce même test ; or l'expérimentation sur des volontaires humains, ne pouvant être qu'exceptionnelle et le singe étant un animal coûteux, les auteurs ont recherché d'autres tests capables de déceler l'entérotoxine.

4/ *Expérimentation par injection - chat - grenouille*

C'est Dolman (130) qui a indiqué le premier que l'injection intra-péritonéale chez le jeune chat ("kitten test") provoquait des accidents caractéristiques.

La toxine est préparée par culture sur gélose semi-fluide, en atmosphère contenant trente pour cent de CO_2, pendant quarante heures, ou sur milieu de Surgalla et Michael (131). Elle est filtrée sur Seitz, puis chauffée pendant 30 minutes au bain-marie bouillant, pour détruire les autres toxines. Les vieux chats étant moins sensibles, la toxine préparée est alors injectée à des jeunes chats de 6 - 8 semaines, d'un poids de 350 - 550 g. par voie intra-péritonéale et à la dose de 0,50 cc. Dolman et Wilson (132) indiquent la dose de 1 - 3 cc de filtrat pour un chat de 500 g.

Si le filtrat contient de l'entérotoxine, l'animal présente les symptômes suivants après une période de 15 - 30 minutes : défécation fréquente, baillements, tendance au sommeil, puis l'animal se lèche les lèvres, présente une abondante salivation et enfin des nausées, tremblements, cris, incoordination motrice, torpeur et enfin des contractions violentes de l'abdomen. Les vomissements et la diarrhée apparaissent en général une demi-heure après l'injection. L'animal est malade pendant une période de 2 à 24 heures puis se remet.

Dolman attribua une grande importance au "kitten test" car les différents "staphylocoques" utilisés provenaient d'aliments ayant provoqué des intoxications et avaient montré des réactions positives aux différents tests in vitro.

Des auteurs roumains (21) constatèrent même qu'un "staphylocoque" ayant provoqué une intoxication alimentaire ne présenta aucun des caractères classiques du pouvoir pathogène in vitro, qu'en outre le filtrat de culture ne montra pas d'activité dermonécrotique ni d'activité létale pour le lapin et que seule l'épreuve du chaton se révéla positive. L'absence de corrélation entre le pouvoir entérotoxique et les autres caractères biologiques est excessivement rare dans la pratique courante et cette communication tendrait à renforcer l'opinion de Dolman et de Mylvard Bayliss (133) sur la valeur du "kitten test".

Cependant, W. M. Hammon (134) a constaté des résultats faussement positifs dûs à des diarrhées non spécifiques et une accoutumance rapidement développée chez les chats sur lesquels on répète ces tests.

Hussemann et Tanner (135) estiment également que ce test ne donne pas entière satisfaction.

De même les auteurs anglo-saxons R. H. Rigdon en 1938, Jones, A. G. Lochead 1939, W. A. Hagen, A. Singen en 1941 et A.B. Jensen en 1945 ont dénié toute spécificité au "kitten test", et, ont reproduit ses principaux signes notamment avec le filtrat du milieu de culture non ensemencé. Ils ont montré également que certains animaux éprouvés avec des cultures de "staphylocoques" sans aucun doute responsables d'intoxications alimentaires, ne manifestaient aucune réaction.

Névot et Coll., ainsi que Richou (136) font également toute réserve sur la valeur de ce test, de plus, pour eux l'injection intra-péritonéale à un chaton de deux mois d'un filtrat de culture de "staphylocoque", obtenu sur un milieu spécial, en atmosphère de CO_2, ne semble avoir qu'un rapport lointain avec l'absorption par l'homme d'un aliment souillé de la même bactérie.

Robinton (137) a réalisé un test comparable sur la grenouille de Hongrie (frog test), malheureusement celle-ci n'apparaît pas plus démonstrative comme animal d'expérience.

3. Conclusions

Les tests d'appréciation du pouvoir pathogène du "staphylocoque" sont nombreux, mais ils sont loin de posséder tous une valeur spécifique. Indiscutablement l'ingestion de toxines par des volontaires humains représente un caractère absolu, mais qui ne peut être mis en oeuvre qu'exceptionnellement ; c'est pourquoi, devant la spécificité toute relative de la plupart des autres tests, on est conduit à effectuer le maximum d'entre eux pour se faire une opinion - non définitive - mais valable sur le pouvoir pathogène d'une souche de "staphylocoque" ; car un test positif, s'il est seul ne doit jamais être considéré comme ayant une valeur absolue.

Les auteurs s'accordent en général pour admettre qu'un "staphylocoque" pathogène a les caractères suivants :

1/ il fermente le mannitol en 48 heures
2/ il produit de la coagulase
3/ il hémolyse le sang de lapin
4/ il est doué du pouvoir dermonécrotique.

Les tests précédents, s'ils sont concordants, ont une valeur certaine, ils suffisent en général pour affirmer le caractère pathogène d'un tel germe.

En second lieu et à titre complémentaire, on pourra rechercher :

1/ la chromogénèse
2/ la liquéfaction de la gélatine
3/ la production de fibrinolysine
4/ le "kitten test".

CHAPITRE III

RECHERCHES PERSONNELLES

- Le but essentiel de celles-ci consistera en la recherche systématique de la flore "staphylococcique" contenue dans les saucisses fraîches au moment de la consommation.

Elle sera effectuée sur de nombreux lots d'une même charcuterie, et nous donnera la qualité bactériologique des produits fabriqués dans cet établissement ; mais les examens seront également pratiqués sur les produits d'autres charcuteries et en particulier d'un établissement semi-industriel, ce qui nous permettra de comparer les flores moyennes respectives des saucisses des différents producteurs. Ces examens porteront donc sur des aliments parfaitement alibiles et nullement dangereux, étant donné qu'aucune intoxication alimentaire n'a été signalée à Toulouse durant ces trois dernières années, et d'autant que nous en avons consommés nous-même sans aucun trouble.

Les numérations seront faites plusieurs fois par mois, de novembre à juin, ce qui nous permettra d'apprécier la valeur de cette flore et au besoin sa variation au cours de l'année.

Nous envisagerons à la fois le côté quantitatif et qualitatif de cette flore et nous essayerons de tirer des conclusions sur le genre, l'espèce et l'origine des germes rencontrés. Notre étude sur le pouvoir pathogène de ceux-ci portera sur un certain nombre de souches isolées à partir de colonies mannitol + isoléés sur le milieu de Chapman, ce dernier caractère étant a priori considéré comme un signe de pathogénicité.

En résumé, à partir de différents lots de saucisses fraîches, nous rechercherons successivement :

1 - La valeur de la flore "staphylococcique" dans un même établissement.

2 - Cette même valeur dans des établissements différents.

3 - Leur variation durant l'année.

4 - L'étude du pouvoir pathogène des germes isolés.

Pour que notre étude soit plus explicite, nous adjoindrons à nos recherches :

5 - La numération de la flore totale.

6 - La recherche des indologènes et des sulfhydrogènes.

Il est en effet coutume en hygiène alimentaire, de rechercher ces deux dernières propriétés, car elles démontrent la production de substances nocives ; nous effectuerons donc également ces trois numérations pour chaque échantillon de saucisse, pour avoir à chaque examen une étude complète et comparée de la flore microbienne contenue dans ceux-ci.

- Nous étudierons également la variation dans le temps de la flore "staphylococcique", de la flore totale, des indologènes et des sulfhydrogènes dans une même saucisse conservée à différentes températures durant plusieurs mois.

La méthode consistera à pratiquer des examens tous les mois sur des saucisses achetées fraîches chez des producteurs différents et divisées en deux lots pour chaque échantillon, l'un mis au frigorifique à plus quatre degrés Celsius, et l'autre à plus quinze degrés Celsius.

L'étude du pouvoir pathogène des "staphylocoques" rencontrés à chaque examen sera également effectuée.

I - TECHNIQUES EMPLOYEES

A/ *MILIEUX D'ETUDE*

1/ *Milieux usuels*

a/ eau peptonée

Le milieu à l'eau peptonée sera utilisé pour effectuer les dilutions décimales en série des différents échantillons de saucisses. La recherche des indologènes et des sulfhydrogènes sera également effectuée en eau peptonée.

b/ gélose ordinaire

Celle-ci sera utilisée pour la numération de la flore totale. La production de pigments par les "staphylocoques" sera également recherchée sur ce milieu.

2/ *Milieux sélectifs*

a/ milieu de Chapman - "Bacto Mannitol Salt Agar" (B.30 - Difco) (138)

La composition de celui-ci est la suivante :

extrait de boeuf	1 g.
Protéose-peptone N° 3 Difco	10 g.
Chlorure de sodium	75 g.
d. mannitol Difco	15 g.
Rouge de phénol	0,025 g.

Pour réhydrater ce milieu, on placera 111 g. de l'extrait deshydraté dans 1 l. d'eau froide distillée, on fera alors bouillir pour dissoudre complètement le milieu ; on répartira ensuite celui-ci en tubes stérilisés à l'autoclave à 121° C. durant 15 minutes ; la réaction finale du milieu doit être de 7,4.

Celui-ci sera utilisé pour isoler les "staphylocoques" et rechercher la fermentation du mannitol.

b/ "Bacto Staphylococcus Medium N° 110" (B.297, Difco) (139)

Composition de ce milieu :

extrait de levure	2,5 g.
tryptone	10 g.
gélatine	30 g.
lactose	2 g.
d. mannitol, Difco	10 g.
Chlorure de sodium	75 g.
phosphate bipotassique	5 g.
agar	15 g.

La préparation de ce milieu s'effectue ici avec 149 g. de l'extrait deshydraté pour un litre d'eau distillée ; le pH final du milieu doit être de 7,0 ; pour éliminer le précipité qui se dépose au fond des tubes à essai, agiter doucement ceux-ci avant de pratiquer l'ensemencement à 55°.

Le milieu est sélectif pour l'isolement des "staphylocoques" ; la production des pigments, de la coagulase, la méthode de Stone pour la liquéfaction de la gélatine peuvent être directement recherchées sur celui-ci, sans avoir recours à de nouveaux ensemencements pour ces tests respectifs.

Les propriétés sélectives de ce milieu sont dûes à sa haute teneur en ClNa. Ces caractéristiques lui donnent une valeur particulière pour l'isolement des "staphylocoques" et spécialement pour ceux suspects d'être pathogènes et responsables d'empoisonnements alimentaires.

Le milieu a l'avantage supplémentaire suivant : à quelques exceptions près, les espèces pathogènes donnent des colonies pigmentées oranges, tandis que les autres donnent des colonies blanches ; les auteurs prétendent que cette relation entre la couleur et la pathogénicité ne peut être obtenue avec aucun autre milieu d'une façon aussi rigoureuse. Quant à Chapman, il nota que la culture des germes autres que les "staphylocoques" était inhibée sur ce milieu et que les colonies de "staphylocoques" pathogènes y poussaient mieux que celles non pathogènes.

Après ensemencement en boîte de Pétri, le milieu doit être incubé à 30° C. durant 48 heures ou à 37° C. durant 43 heures. On recherche alors s'il y a eu ou non, production de pigment orange ou jaune par certaines colonies.

Les colonies ayant produit un pigment sont alors repiquées pour pratiquer le test de la coagulase.

La fermentation du mannitol sera observée en plaçant une goutte de l'indicateur au pourpre de bromo-crésol sur chaque colonie colorée, tout changement de couleur de l'in-

dicateur signera une réaction positive.

On verse alors 5 cc de solution saturée de sulfate d'ammonium pris dans l'étuve, et, on laisse ainsi 10 minutes ; l'apparition d'une zone claire autour de certaines colonies, indique que celles-ci liquéfient la gélatine. Chapman estime qu'une solution saturée d'acide salicylique à 20 % est supérieure au sulfate d'ammonium saturé pour ce test.

Quant à la recherche de la coagulase, elle s'effectue à partir de colonies repiquées comme nous l'avons vu précédemment et laissées 16 heures à l'étuve.

En conclusion, nous retiendrons que :

- le milieu est sélectif pour les "staphylocoques" au même titre que celui de Chapman, et, doit théoriquement avoir les mêmes qualités.

- Les colonies a priori pathogènes seront grosses et pigmentées, les autres petites et blanches, après incubation de 43 heures à 37° C.

- Les colonies fermentant le mannitol pourront être directement recherchées sur ce milieu.

- La réaction de Stone, déterminant le pouvoir gélatinolytique, pourra l'être de même.

c/ "Bacto Chapman Stone Medium" (B.313-Difco)(140)

Composition de ce milieu :

Extrait de levure	2,5 g.
Tryptone	10 g.
Gélatine	30 g.
d. mannitol, Difco	10 g.
Chlorure de sodium	55 g.
Sulfate d'ammonium	75 g.
Phosphate dipotassique	5 g.
Agar	15 g.

La préparation de ce milieu s'effectue ici avec 202 g. de l'extrait deshydraté pour un litre d'eau distillée ; le pH final de celui-ci doit être de 7,0 ; le milieu solidifié doit être opaque et blanc.

Ce milieu est sélectif pour l'isolement des "staphylocoques", il a été préparé selon la formule déterminée par Chapman ; il est identique au précédent, à ces deux différences près :

- Le taux de chlorure de sodium n'est que de 55 pour mille au lieu de 75 pour mille.

- Du sulfate d'ammonium est inclus dans ce milieu ce qui permet de déterminer directement la "réaction de Stone".

Après ensemencement en boîte de Pétri, le milieu doit être incubé à trente degrés Celsius durant 48 heures ou à 37° C. durant 43 heures.

Toute colonie orange, entourée d'une zone claire, fermentant le mannitol et étant coagulase positive, doit être considérée comme pathogène. Les colonies non pigmentées, même si elles sont entourées d'une zone claire, ne sont pas pathogènes. L'épreuve de la coagulase, est recherchée comme avec le milieu précédent. Il en est de même pour la fermentation du mannitol.

d/ Etude comparée théorique des trois milieux sélectifs précédents

- Les propriétés sélectives doivent être les mêmes pour les trois milieux ; ceci est dû à la haute teneur en ClNa. Seul le "Bacto Chapman Stone Medium" serait a priori un peu moins sélectif, mais cette concentration de 55 pour mille est cependant assez élevée pour éliminer les autres germes.

- La production de pigment ne peut être recherchée que sur le "Bacto Staphylococcus Medium" et le "Bacto Chapman Stone Medium".

- La fermentation du mannitol peut être déterminée avec les trois milieux ; la méthode la plus avantageuse est cependant celle du milieu de Chapman car elle ne demande pas de manipulation secondaire.

- "La réaction de Stone" ne peut être également recherchée qu'avec les deux derniers milieux ; le "Bacto Chapman Stone Medium" a l'avantage de la déterminer directement.

- En résumé, les milieux "Difco" semblent plus intéressants, car ils ont, en plus de leur pouvoir sélectif pour les "staphylocoques", l'avantage de permettre la recherche simultanée de nombreux tests de pathogénicité de ces mêmes germes.

3/ *Autres milieux*

a/ Milieu de Stone

Le milieu a la composition suivante :

eau	1000 cc
gélatine	30 g.
extrait de boeuf (pH : 6,8) ..	30 g.
gélose poudre	30 g.

Il faut couler le milieu en boîte de Pétri la veille de l'ensemencement. Celui-ci s'effectue en faisant quelques dépôts car le milieu est mou.

On place à l'étuve durant 24 heures à 37° C, et, on verse 4 - 5 cc de solution saturée de sulfate d'ammonium, en 2 - 5 minutes la surface du milieu va s'opacifier, les colonies gélatinolytiques s'entourent alors d'une auréole transparente.

Nous avons déjà recherché ce test avec le milieu "Chapman Stone Medium" sur un très grand nombre de colonies, celui-ci nous servant en effet de milieu sélectif pour les "staphylocoques" lors de chaque examen de saucisse fraîche ; mais nous avons voulu vérifier nos résultats en utilisant un milieu destiné spécialement à ce test ; de plus, nous avons recherché si le pouvoir gélatinolytique ne variait pas dans le temps. En effet le premier test est recherché avec des colonies ensemencées à partir de saucisse fraîche avec le "Bacto Chapman Stone Medium" et le second avec une ou deux colonies isolées après chaque examen de saucisse. Six mois après le repiquage avec le milieu de Stone.

b/ Milieu synthétique

Composition de ce milieu :

Agar	1,5 %
Phosphate d'ammonium	0,1 %
Glucose	1,0 %
Chlorure de potassium	0,02 %
Sulfate de magnésium	0,02 %

Au moment de la préparation de ce milieu, on ajoutera du pourpre de bromo-crésol comme indicateur.

L'intérêt de la culture des "staphylocoques" sur ce milieu réside dans le fait que, seuls certains germes sont capables d'utiliser l'azote du phosphate d'ammonium (seule source d'azote), quant aux microcoques pathogènes, ils n'ont pas cette propriété.

c/ Milieu nitraté

Composition de ce milieu :

Peptone de Witte	10 g.
Nitrate de Potassium	1 g.
Chlorure de sodium	3 g.
Eau distillée	1000 cc

D'après Bergey , la propriété de réduire les nitrates en nitrites, associée à de nombreux autres tests et examens, permet de caractériser le genre et l'espèce des "staphylocoques", c'est donc dans ce but que nous avons recherché celle-ci.

La présence des nitrites est révélée avec la réaction de Tromsdorff qui donne une coloration bleue du milieu.

B/ *TECHNIQUES ADOPTEES POUR LA MISE EN EVIDENCE DU POUVOIR PATHOGENE DES "STAPHYLOCOQUES"*

Les différents tests utilisés seront les suivants :

1/ *Etude du pigment*

Celui-ci sera observé après 48 heures à l'étuve à 37° C. sur :

- le milieu gélosé ordinaire
- le "Bacto Chapman Stone Medium"
- le "Bacto Staphylococcus Medium N° 110"

Les deux derniers milieux seront ensuite laissés à la température du laboratoire pendant 48 heures et les colonies au préalablement blanches, ayant pris une couleur orange ou citrine seront testées sur le milieu de Chapman pour apprécier le pouvoir de fermenter le mannitol.

2/ *Fermentation du mannitol*

Celle-ci sera recherchée sur le milieu de Chapman après 48 heures à l'étuve à 37° C.

3/ *Production de la Staphylocoagulase*

Certaines colonies ayant fermenté le mannitol seront isolées et on recherchera si elles produisent la coagulase.

Ce test sera également pratiqué sur les colonies citrines après culture de 48 heures sur les milieux Difco, ou sur celles ayant donné une "réaction de Stone" positive sur le "Chapman Stone Medium".

4/ *Production des Hémolysines*

Les colonies isolées pour la recherche de la production de la staphylocoagulase seront également testées pour la production des hémolysines.

5/ *Recherche du pouvoir gélatinolytique - test de Stone*

Le "Bacto Chapman Stone Medium" étant utilisé comme milieu sélectif au même titre que le milieu de Chapman proprement dit, le pouvoir gélatinolytique pourra être observé sur un nombre très important de "staphylocoques". Il nous donnera ainsi une idée encore plus précise du rapport entre ceux gélatine + et ceux gélatine - contenus dans les saucisses fraîches.

De plus ce test sera recherché en second lieu sur toutes les colonies isolées après chaque examen de saucisse, quelques mois après l'isolement ; mais celui-ci sera cette fois effectué avec le milieu de Stone.

Sur ces mêmes colonies on recherchera ensuite :

6/ *Le pouvoir dermonécrotique sur le lapin*

Dans l'étude des techniques utilisées, nous devons mentionner que nous avons également recherché :

7/ *La possibilité de culture sur un milieu synthétique déterminé.*

8/ *La transformation des nitrates en nitrites.*

Cela, non point pour juger du pouvoir pathogène des germes, mais pour mieux nous aider à les classer, selon la clé de détermination du Bergey's Manual.

C/ *MANIPULATIONS EFFECTUEES*

1/ Les saucisses seront toujours manipulées dans les récipients stériles, les instruments employés le seront également.

2/ 4 g. de viande maigre seront finement broyés.

3/ 36 g. d'eau peptonée seront ajoutés à ce broyat,et nous obtiendrons notre première dilution ; celle-ci sera donc au dixième.

4/ 1 cc de cette dernière est placé dans un tube à essai contenant 9 cc d'eau peptonée. La dilution de ce tube N° 1 sera au 1/100.

5/ Des dilutions décimales seront effectuées jusqu'au dix millionnième (le tube n° 2 correspondra à la dilution au millième, le tube n° 3 au dix millième, le tube n° 4 au cent millième ...).

6/ les tubes n° 2, n° 3 et n° 4 seront seuls utilisés pour les ensemencements sur gélose et milieux sélectifs pour les "staphylocoques". Les tubes n° 5 et n° 6 n'auront d'intérêt que pour les produits alimentaires ayant à priori une flore microbienne importante.

7/ La méthode utilisée pour la numération des germes sera donc la suivante :

1 cc de chacune des trois dilutions contenues dans ces trois tubes sera ensemencé en boîtes de Pétri dans les milieux suivants, à la température de 50° C.

- Gélose ordinaire
- "Bacto Mannitol Salt Agar"
- "Bacto Staphylococcus Medium n° 110"
- "Bacto Chapman Stone Medium"

Les boîtes de Pétri seront alors placées à l'étuve à 37° et la lecture des résultats sera effectuée après 48 heures.

Le nombre des colonies ayant poussé sur la gélose de la boîte de Pétri correspondant à l'ensemencement du tube n° 2 sera multiplié par mille (dilution de celle-ci) et nous obtiendrons ainsi le chiffre de la flore totale au gramme. Nous pourrions également calculer celle-ci en multipliant respectivement par 10 000 et 100 000 le nombre de colonies ayant poussé sur la gélose des boîtes de Pétri correspondant aux ensemencements des tubes n° 3 et n° 4 ; mais ici les causes d'erreurs seraient beaucoup plus à craindre, car les dilutions sont de moins en moins rigoureuses quand elles sont trop grandes.

Nos ensemencements correspondants aux tubes n° 3 et 4 n'auront qu'une valeur relative ; ils nous permettront cependant de vérifier si nos dilutions sont exactes, et, pour le cas où le nombre de colonies serait trop élevé sur la gélose de la boîte de Pétri n° 2, notre numération serait effectuée sur les géloses ensemencées avec les dilutions suivantes.

Il en sera exactement de même pour déterminer la valeur de la flore "staphylococcique" ; mais ici, nous avons trois milieux sélectifs, aux propriétés à priori identiques, nous pourrons donc : constater si les résultats concordent toujours, ou alors, s'il y a des différences, et, si oui, vérifier si elles sont toujours dans le même sens.

8/ La fermentation du mannitol sera appréciée sur le milieu de Chapman après le même délai à l'étuve. Nous ferons une numération des souches mannitol +, ce qui nous permettra d'établir le rapport avec celles qui ne le sont pas.

9/ La production des pigments le sera sur le milieu gélosé et sur les deux milieux "Difco", nous pourrons ainsi comparer la valeur de ceux-ci pour la mise en évidence de la chromogénèse des "staphylocoques".

10/ Le pouvoir gélatinolytique ou "réaction de Stone" le sera sur le "Bacto Chapman Stone Medium". Le grand nombre de colonies identifiées sur ce milieu, nous permettra donc d'avoir une idée du pourcentage des "staphylocoques" gélatinolytiques contenus dans les saucisses fraîches.

11/ Après l'examen de chaque échantillon de saucisse, une ou deux colonies ayant donné une réaction positive au test de Stone, fermenté le mannitol ou produit du pigment, seront repiquées en strie sur gélose inclinée et en eau peptonée ; nous stockions ainsi les différentes souches obtenues et n'entreprenions les recherches suivantes que lorsque nous en possédions un nombre suffisant :

- Production de coagulase
- Production d'hémolysines
- Réaction de Stone
- Pouvoir dermonécrotique sur le lapin
- Culture sur milieu synthétique
- Transformation des nitrates en nitrites.

12/ Quant aux tubes à essai renfermant les dilutions décimales de saucisse en eau peptonée, ils seront également mis à l'étuve durant 48 heures, après avoir préalablement placé du papier au sous-acétate de plomb dans ceux-ci pour la numération des sulfhydrogènes.

13/ Enfin, 48 heures après l'ensemencement, la recherche des indologènes sera effectuée avec le réactif d'Ehrlich.

II - RESULTATS OBTENUS

A/ *COMPTE RENDU COMPLET D'UN EXAMEN DE SAUCISSE*

A titre d'exemple, nous allons reproduire intégralement le compte rendu de l'examen d'une saucisse déterminée, tel qu'il est consigné dans notre cahier d'analyses ; cette saucisse fraîche provenait d'une charcuterie artisanale de la ville de Toulouse, elle fut immédiatement analysée, et nous avons obtenu les résultats suivants :

1/ *Numération des germes sur les boîtes de Pétri*

Colonies isolées sur gélose :
- Boîte de Pétri N° 2 : 180 colonies
- Boîte de Pétri N° 3 : 16 colonies
- Boîte de Pétri N° 4 : 3 colonies

Colonies isolées sur Chapman :
- Boîte de Pétri N° 2 : 120 colonies (dont 5 mannitol +)
- Boîte de Pétri N° 3 : 13 colonies (dont 2 mannitol +)
- Boîte de Pétri N° 4 : 0 colonie

Colonies isolées sur le "Bacto Staphylococcus Medium N°110"
- Boîte de Pétri N° 2 : 80 colonies
- Boîte de Pétri N° 3 : 8 colonies
- Boîte de Pétri N° 4 : 1 colonie

Colonies isolées sur le "Bacto Chapman Stone Medium" :
- Boîte de Pétri N° 2 : 115 colonies
- Boîte de Pétri N° 3 : 15 colonies
- Boîte de Pétri N° 4 : 3 colonies

2/ *Production de pigment*

Aucune colonie n'a produit de pigment dans cet examen.

3/ *Réaction de Stone*

Aucune colonie ne s'est révélée gélatinolytique sur le "Bacto Chapman Stone Medium".

4/ *Fermentation du mannitol*

Cinq colonies sur cent vingt cinq ont fermenté le mannitol dans la boîte de Pétri N° 2. Le rapport entre les colonies mannitol + et mannitol - pour cet examen, est donc de l'ordre du vingt-cinquième.

Une de ces colonies sera isolée et nous rechercherons son pouvoir pathogène à l'aide des différents tests énumérés plus haut.

5/ *Germes totaux au gramme*

La numération de la flore totale est effectuée, comme nous l'avons expliqué précédemment, à partir de la boîte de Pétri N° 2 ensemencée avec la dilution au millième, la valeur de celle-ci est donc obtenue en multipliant le nombre de colonies ayant poussé dans la gélose de cette boîte par mille, il en sera de même pour la numération des "staphylocoques"

180 x 1000 :: 180 000

La flore totale contenue dans cette saucisse est donc de l'ordre de 180 000 germes au gramme.

6/ *"staphylocoques" au gramme*

120 x 1000 : : 120 000

Nous avons effectué la numération de ceux-ci à partir du milieu de Chapman et non des milieux "Difco" ; en effet nous constatons ici que le premier est celui des trois où les "staphylocoques" poussent le mieux. Nous reparlerons de cette constatation plus loin, mais nous pouvons d'ores et déjà dire que cet état de fait se vérifiera tout au long de nos expériences.

Nous avons donc choisi le nombre de colonies ayant poussé sur Chapman, car il est le plus élevé des trois : ce milieu se prête donc mieux à une analyse rigoureuse.

7/ *Indologènes au gramme*

Seuls les tubes N° 1 et 2 ont produit de l'indol, nous avons donc au moins 1000 indologènes au gramme.

8/ *Sulfhydrogènes au gramme*

De l'hydrogène sulfuré a été produit dans les tubes N° 1, 2 et 3, il y a donc au moins 10 000 sulfhydrogènes au gramme.

9/ *Etude du pouvoir pathogène du "staphylocoque" isolé*

Ce germe avait été repiqué à partir d'une grosse colonie ayant fermenté le mannitol ; les examens et tests pratiqués ultérieurement nous ont donné les résultats suivants, permettant de finir de caractériser ce germe.

Pigment -
Mannitol +
Coagulase -
Hémolysines -
Test de Stone -
Pouvoir dermonécrotique -

En conclusion, cet examen nous a donné un aperçu quantitatif des flores microbiennes contenues dans une saucisse fraîche ; en ce qui concerne le "staphylocoque" isolé, à priori pathogène à cause de son aptitude à utiliser le mannitol, il s'est révélé négatif à tous les autres tests et nous croyons pouvoir affirmer que nous étions en présence d'un germe non pathogène.

Nous avons donc exposé ici le résultat analytique de l'examen d'un échantillon de saucisse, et nous avons tenu à le faire pour montrer de quelle manière nous opérions exactement ; dans les pages qui vont suivre, différentes courbes et différents tableaux, relatifs à chacune de nos numérations microbiennes, ou aux différents tests recherchés, résumeront nos travaux.

B/ *RESULTATS DES RECHERCHES EFFECTUEES SUR LES SAUCISSES FRAICHES*

La saucisse fraîche provenait de deux charcuteries artisanales de la ville de Toulouse (N° I et II) et d'une charcuterie semi-industrielle (N° III) fournissant l'économat de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse. Chaque échantillon a été analysé dès sa réception.

1/ *Numération des germes totaux, des "staphylocoques", des sulfhydrogènes et des indologènes.*

I/ CHARCUTERIE N° I

a/ germes totaux

Les valeurs minimales et maximales rencontrées au cours de nos examens ont été respectivement 220 000 et 600 000 germes au gramme ; quant au chiffre moyen de cette flore totale, il est de l'ordre de 350 000 germes au gramme.

Les examens ont été pratiqués à différents mois de l'année comme le précisent le tableau et les courbes, mais nous n'avons pas trouvé de variation sensible de la flore totale en fonction de la saison ; à noter cependant que l'échantillon le plus riche en germes a été celui du mois de mars ; nous constaterons d'ailleurs qu'il en sera de même pour les échantillons des deux autres charcuteries.

b/ "staphylocoques"

Les valeurs minimales et maximales sont respectivement 130 000 germes et 600 000 germes au gramme ; le chiffre moyen de cette flore est de l'ordre de 300 000.

Il y a ici une proportionalité très nette avec le nombre des germes totaux. Trois de nos résultats paraissent cependant à première vue paradoxaux, car la numération des "staphylocoques" nous a donné trois fois des chiffres supérieurs à ceux de la numération de la flore totale.

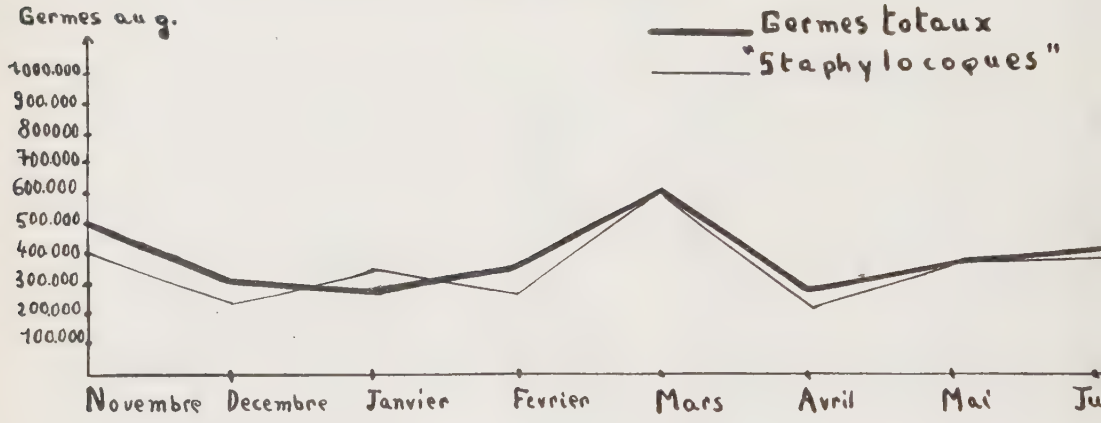
Nos trois résultats atypiques sont les suivants :

Examen N° 4
germes totaux : 220 000 par g.
"staphylocoques" : 280 000 par g.
Examen N° 5
germes totaux : 320 000 par g.
"staphylocoques" : 420 000 par g.

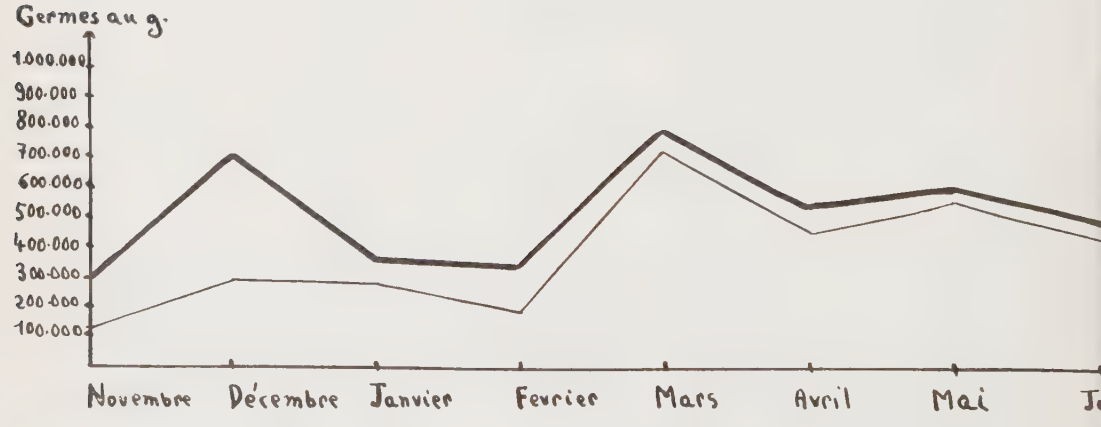
NUMERATION DES GERMES DE LA SAUCISSE FRAICHE (au gramme)

Différents examens	Germes totaux	"Staphylo-coques"	Sulfhydrogènes	Indologènes
CHARCUTERIE N° I				
I Novembre	500.000	400.000	10.000	10.000
II Décembre	360.000	300.000	10.000	10.000
III Décembre	240.000	180.000	10.000	1.000
IV Janvier	**220.000**	280.000	10.000	10.000
V Janvier	320.000	420.000	10.000	10.000
VI Février	320.000	**130.000**	10.000	10.000
VII Février	400.000	420.000	1.000	10.000
VIII Mars	**600.000**	**600.000**	10.000	10.000
IX Avril	280.000	220.000	10.000	1.000
X Mai	360.000	360.000	10.000	10.000
XI Juin	410.000	380.000	10.000	10.000
CHARCUTERIE N° II				
I Novembre	300.000	**130.000**	10.000	10.000
II Décembre	800.000	260.000	10.000	1.000
III Décembre	600.000	350.000	10.000	1.000
IV Janvier	500.000	340.000	10.000	1.000
V Janvier	**220.000**	200.000	100	1.000
VI Février	330.000	170.000	1.000	100
VII Mars	800.000	720.000	10.000	10.000
VIII Avril	550.000	450.000	10.000	10.000
IX Mai	350.000	300.000	1.000	10.000
X Mai	**850.000**	**800.000**	1.000	10.000
XI Juin	350.000	280.000	1.000	10.000
XII Juin	600.000	580.000	1.000	10.000
CHARCUTERIE N° III				
I Novembre	200.000	160.000	1.000	10.000
II Décembre	180.000	150.000	1.000	10.000
III Janvier	**250.000**	**220.000**	1.000	10.000
IV Février	**80.000**	**70.000**	1.000	1.000
V Mars	220.000	200.000	1.000	10.000
VI Avril	180.000	70.000	100	1.000
VII Avril	150.000	**55.000**	100	1.000
VIII Mai	110.000	80.000	100	1.000
IX Juin	210.000	150.000	100	1.000

Variations de la flore totale et "staphylococcique" durant l'année



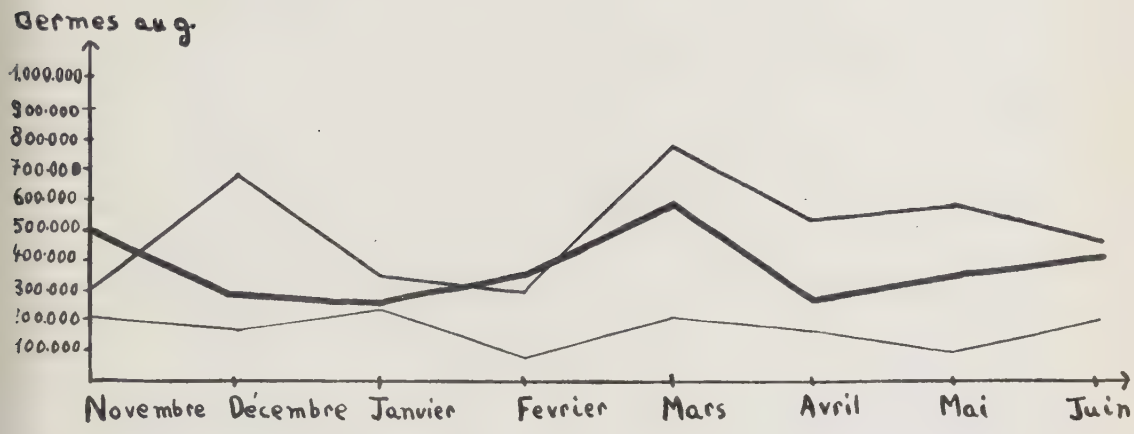
Charcuterie N° I



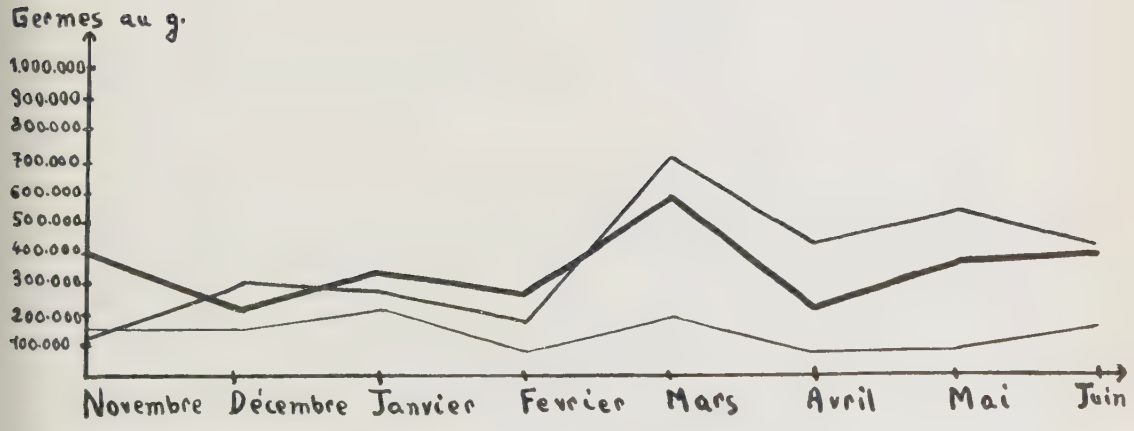
Charcuterie N° II

Charcuterie N° III

Etude comparée des flores microbiennes des saucisses des différents établissements



Germes totaux



"Staphylocoques"

——— charcuterie N° I
——— charcuterie N° II
——— charcuterie N° III

Examen N° 7
Germes totaux : 400 000 par g.
"Staphylocoques" : 420 000 par g.

Les résultats certes ne sont pas très supérieurs, et nous serions en droit de penser qu'ils sont dûs à une erreur commise lors de la numération ou à un mauvais ensemencement par suite d'une dilution imparfaite.

Or, si dans tous les autres cas, le nombre des "staphylocoques" est inférieur à celui des germes totaux, il l'est en général de très peu, les examens N° 8 et 10 nous donnent même des chiffres identiques pour les deux flores.

Dans l'étude de la variation de la flore "staphylococcique" dans un produit de charcuterie conservé à différentes températures durant plusieurs mois, nous constaterons même que celle-ci atteint des valeurs bien supérieures.

Pour l'instant, nous admettrons la véracité de ces résultats, nous envisagerons plus loin quelles peuvent être les causes de cet état de fait, et, nous émettrons à ce sujet différentes hypothèses susceptibles de les expliquer.

c/ sulfhydrogènes

Leur nombre varie de 1 000 à 10 000 au gramme, mais le chiffre de 10 000 est pour ainsi dire toujours rencontré.

d/ indologènes

Les valeurs minimales, maximales et moyennes précédentes sont superposables.

2/ CHARCUTERIE N° 11

a/ germes totaux

Leur nombre varie de 220 000 à 850 000 au gramme, et la valeur moyenne de ceux-ci est de l'ordre de 500 000.

Ici également, la saison n'a pas une influence notable sur la flore totale et nous trouvons des résultats élevés aussi bien en décembre (800 000 - 600 000) qu'en mars (800 000), mai (850 000) et juin (600 000). Notons cependant que nous retrouverons ici la même richesse en germes de la saucisse examinée en mars que pour l'échantillon de la charcuterie précédente, à la même époque. Les deux clochers de décembre et de mars, sont nets sur la courbe, mais les valeurs maximales de mai et de juin ont été masquées par des examens concommitt nts, qui n'ont révélé qu'une flore peu importante et avec lesquels il a fallu réaliser une moyenne arithmétique.

Nous constatons donc que les résultats peuvent certes varier au cours de l'année mais, que des différences importantes peuvent être observées durant le même mois dans des lots successifs de saucisses.

b/ "staphylocoques"

Les valeurs minimales et maximales sont respectivement 130 000 et 800 000 germes au gramme ; le chiffre moyen de cette flore "staphylococcique" est de l'ordre de 380 000.

Leur nombre n'est ici jamais supérieur à celui des germes totaux, auquel il est d'ailleurs proportionnel, mais il faut remarquer que dans tous les cas, la différence entre les deux numérations est très faible et certainement loin de la réalité.

c/ sulfhydrogènes

Leur nombre varie de 100 à 10 000, et, le chiffre 1000 est assez souvent rencontré ; les germes sulfhydrogènes seraient donc moins nombreux dans cette saucisse, bien que la valeur de la flore totale de celle-ci soit en moyenne supérieure à celle des échantillons de la charcuterie N° 1.

d/ indologènes

Mêmes résultats moyens et mêmes conclusions que ci-dessus pour les sulfhydrogènes.

3/ CHARCUTERIE N° III

a/ germes totaux

Leur nombre varie de 80 000 à 250 000, quant à la valeur moyenne de ceux-ci elle est de l'ordre de 170 000 germes au gramme ; c'est donc une courbe écrasée vers le bas qui s'en dégage.

Nous notons donc ici l'absence de clocher sur la courbe représentant les différents résultats au cours de l'année, de plus, la valeur de la flore totale rencontrée dans ces échantillons de saucisse a toujours été - et de beaucoup - inférieure à celle des échantillons des deux autres charcuteries.

Nous nous contenterons de donner ici une explication plausible, en prétendant que cet état de chose s'explique du fait que cette dernière charcuterie à caractère semi-industriel travaille dans de meilleures conditions hygiéniques que les deux autres établissements de la ville de Toulouse ayant un caractère purement artisanal.

b/ "staphylocoques"

Leur nombre varie de 70 000 à 220 000 et la valeur moyenne de ceux-ci est de l'ordre de 140 000 germes par gramme. Ici également la valeur de la flore "staphylococcique" est proportionnelle à celle de la flore totale, elle n'est jamais supérieure à cette dernière, mais toujours du même ordre, comme dans les examens précédents.

c/ sulfhydrogènes

Ils varient de 100 à 1000 au gramme, leur valeur est donc très inférieure à celles trouvées précédemment ; leur nombre restreint semble donc en rapport avec la valeur de la flore totale qui est peu élevée dans cette saucisse.

d/ indologènes

Ceux-ci semblent être relativement nombreux en fonction de la faible importance des germes totaux ; leur nombre moyen est en effet de 5 000 au gramme .

En conclusion :

- La valeur moyenne de la flore totale pour chaque charcuterie a été successivement de 350 000, 500 000 et 170 000 germes au gramme, les valeurs maximales rencontrées étaient de l'ordre de 800 000 à 850 000.

Quant à la variation de la flore dans le temps, les courbes nous indiquent (à part un clocher en décembre, pour la charcuterie N° II) que la valeur de celle-ci semble légèrement supérieure de mars à juin par rapport aux quatre mois précédents.

- La valeur moyenne de la flore "staphylococcique" pour chaque charcuterie a été successivement de 300 000, 380 000 et 140 000 germes au gramme ; les valeurs maximales rencontrées étaient de l'ordre de 700 000 à 800 000.

Quant à la variation de la flore dans le temps, elle se superpose à peu près exactement à celle de la flore totale. Nous noterons également la similitude des résultats lors de chaque examen pour ces deux flores.

- Quant aux indologènes et aux sulfhydrogènes, ils ont une valeur moyenne de 10 000 pour la première charcuterie et de 5 000 pour la seconde ; les résultats moyens obtenus pour le troisième établissements sont de 1000 pour les sulfhydrogènes et 4000 pour les indologènes, ils sont donc plus faibles, mais ils concordent avec ceux de la flore totale de cette saucisse qui a les valeurs les plus faibles.

2/ Etude du pouvoir pathogène des "staphylocoques" isolés.

1/ PRODUCTION DE PIGMENT

Nous n'avons trouvé au cours de nos différents examens qu'un nombre infiniment restreint de colonies ayant produit du pigment après 48 heures à l'étuve. Nous avons cependant isolé 4 colonies de "staphylocoque" doré, ce sont respectivement les souches 27, 28, 29 et 33.

2/ FERMENTATION DU MANNITOL

Les 50 souches isolées ont été choisies parmi celles ayant fermenté celui-ci ; il est bon de noter ici que les 4 souches pigmentées fermentaient le mannitol.

Lors de chaque examen, nous avons pu établir sur le milieu de Chapman, un rapport entre les souches mannitol + et les souches mannitol -, et nous pouvons dire que le rapport moyen est de 1/30. Etat donné le nombre important de "staphylocoques" identifiés à chaque examen, nous constatons que le nombre de souches mannitol + est relativement élevé.

3/ PRODUCTION DE "STAPHYLOCOAGULASE"

Seule la souche N° 25 s'est révélée positive à ce test.

4/ PRODUCTION D'HEMOLYSINES

La souche N° 25 a également produit des hémolysines (α et β).

5/ TEST DE STONE - POUVOIR GELATINOLYTIQUE

La recherche systématique de celui-ci avec le "Bacto Chapman Stone Medium" sur toutes les colonies ayant poussé sur ce milieu, ne nous a permis d'isoler que 5 colonies répondant positivement à ce test, ce sont respectivement les souches N° 21, 22, 25, 27, et 34.

Quant à celui de Stone proprement dit, que nous avons effectué par la suite sur toutes les colonies isolées, il a confirmé le premier test, en ce sens que toutes les souches se montrèrent incapables de liquéfier la gélatine, à l'exception des cinq, précédemment gélatinolytiques sur le "Bacto Chapman Stone Medium", mais, ces dernières ne se révelèrent que faiblement positives au "test de Stone".

RECHERCHE DU POUVOIR PATHOGENE DES SOUCHES ISOLEES

Souches isolées	Production de pigments	Fermentation du mannitol	Production de coagulase	Production d'hémolysines	Test de Stone	Pouvoir Dermonécrotique	Nitrates reduits en nitrites	Culture sur milieu synthétique	Résultats
1	-	+	-	-	-	-	+	-	-
2	-	+	-	-	-	-	+	-	-
3	-	+	-	-	-	-	+	-	-
4	-	+	-	-	-	-	+	-	-
5	-	+	-	-	-	-	+	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	-	+	-	-	-	-	+	-	-
9	-	+	-	-	-	-	+	-	-
10	-	+	-	-	-	-	+	-	-
11	-	+	-	-	-	-	+	-	-
12	-	+	-	-	-	-	+	-	-
13	-	+	-	-	-	-	+	-	-
14	-	+	-	-	-	-	+	-	-
15	-	+	-	-	-	-	+	-	-
16	-	+	-	-	-	-	+	-	-
17	-	+	-	-	-	-	+	-	-
18	-	+	-	-	-	-	+	-	-
19	-	+	-	-	-	-	+	-	-
20	-	+	-	-	-	-	+	-	-
21	-	+	-	-	+	-	-	-	-
22	-	+	-	-	+	-	+	-	-
23	-	+	-	-	-	-	+	-	-
24	-	+	-	-	-	-	+	-	-
25	-	+	+	+	+	+	-	-	+
26	-	+	-	-	-	-	+	-	-
27	+	+	-	-	+	-	+	-	-
28	+	+	-	-	-	-	+	-	-
29	+	+	-	-	-	-	+	-	-
30	-	+	-	-	-	-	+	-	-
31	-	+	-	-	-	-	-	-	-
32	-	+	-	-	-	-	+	-	-
33	+	+	-	-	-	-	-	-	-
34	-	+	-	-	+	-	+	-	-
35	-	+	-	-	-	-	+	-	-
36	-	+	-	-	-	-	-	-	-
37	-	+	-	-	-	-	+	-	-
38	-	+	-	-	-	-	-	-	-
39	-	+	-	-	-	-	+	-	-
40	-	+	-	-	-	-	+	-	-
41	-	+	-	-	-	-	+	-	-
42	-	+	-	-	-	-	+	-	-
43	-	+	-	-	-	-	+	-	-
44	-	+	-	-	-	-	-	-	-
45	-	+	-	-	-	-	+	-	-
46	-	+	-	-	-	-	+	-	-
47	-	+	-	-	-	-	+	-	-
48	-	+	-	-	-	-	+	-	-
49	-	+	-	-	-	-	-	-	-
50	-	+	-	-	-	-	+	-	-

6/ POUVOIR DERMONECROTIQUE

Seule la souche N° 25 a eu un pouvoir dermonécrotique sur le lapin.

- Quant aux résultats de la culture sur milieu synthétique spécial et de la transformation des nitrates en nitrites par ces différentes souches, bien que n'ayant aucun rapport avec le pouvoir pathogène de celles-ci, ils ont été insérés dans ce tableau dans l'intention de grouper tous les tests qui seront utiles plus tard pour classer ces différents cocci selon la clé de détermination du "Bergey's Manual".

- En conclusion, de l'ensemble des tests, il ressort que seule la souche N° 25 doit être considérée comme pathogène, car elle est en effet :

Pigment	-
Mannitol	+
Coagulase	+
Hémolysines	+
Réaction de Stone	+
Pouvoir dermonécrotique	+

Toutes les autres souches, n'ont qu'un dénominateur commun comme test de pathogénicité positif, à savoir, celui de la fermentation du mannitol, les autres tests se sont révélés négatifs en général, mis à part quatre colonies pigmentées et cinq ayant un pouvoir gélatinolytique, mais celles-ci répondirent négativement aux autres tests ; ce sont donc, par voie de conséquence, également des souches non pathogènes.

Nos numérations et examens successifs nous ont donc montré qu'une saucisse fraîche vendue dans le commerce, n'ayant provoqué aucun trouble parmi les consommateurs, pouvaient renfermer de 300 000 à 800 000 "staphylocoques" au gramme.

Le pouvoir pathogène des souches mannitol +, à priori pathogènes, isolées des différents échantillons, s'est révélé négatif pour toutes celles-ci, à l'exception d'une seule, mais le caractère isolé de cette constatation ainsi que la valeur "relativement" faible de la flore "staphylococcique" au gramme dans cette saucisse (340 000), expliquent aisément que cette souche n'ait pas pu provoquer d'accidents chez ceux qui l'ont ingérée.

C/ *RESULTAT DES RECHERCHES INTERESSANT LES SAUCISSES SOUMISES A UN VIEILLISSEMENT A DES TEMPERATURES DIFFERENTES*

La saucisse fraîche est immédiatement analysée et ensuite divisée en plusieurs lots.

Un premier lot sera conservé à + 4° C.

Un deuxième lot sera conservé à + 15° C.

L'expérience portera sur deux échantillons de saucisse provenant de deux charcuteries artisanales de la ville de Toulouse.

Les numérations seront effectuées tous les mois.

1/ *Variation de la flore totale*

a/ Charcuterie N° I

Le nombre de germes totaux était de 360 000 au gramme dans la saucisse fraîche. Après un mois, il est passé par un maximum de 3 250 000 pour la saucisse conservée à + 4° et de 4 100 000 pour celle conservée à + 15° C. ; la flore de cette dernière s'est maintenue durant le mois suivant (4 000 000), alors que la saucisse conservée à + 4° voyait la sienne diminuer à 1 500 000.

Durant le mois suivant celle-ci diminuait légèrement (1000 000) pour disparaître presque totalement le cinquième mois (30 000).

Quant à celle de la saucisse conservée à + 15°, après être restée en plateau aux environs de 4 000 000 durant les deux et troisième mois, elle est brusquement descendue à 300 000 le quatrième mois, et, le cinquième mois, a atteint une valeur identique à celle de la saucisse conservée à + 4°, c'est-à-dire 30 000 germes par gramme.

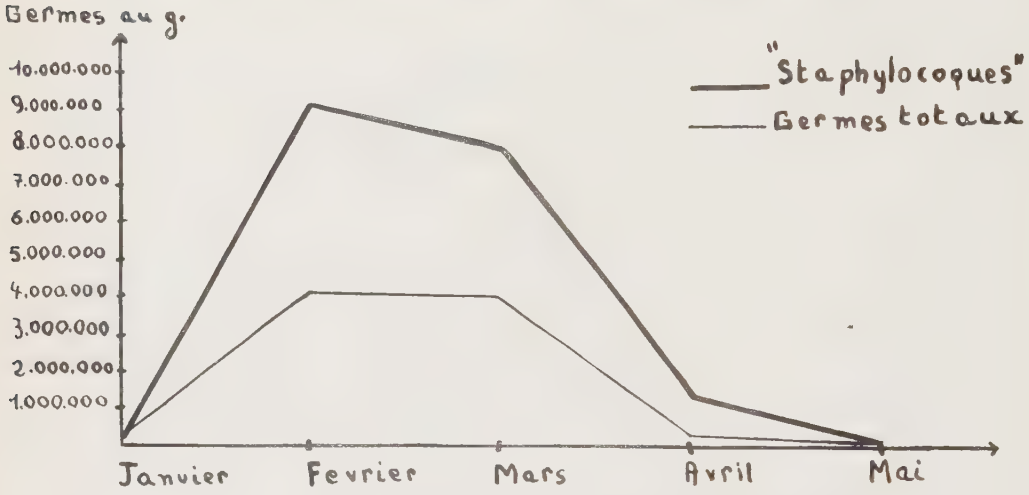
- En conclusion, comme nous le montre d'ailleurs très bien la courbe, après une multiplication intense durant le premier mois de conservation, les flores du même échantillon, conservé à différentes températures, se sont maintenues plus ou moins longtemps et à une valeur plus ou moins élevée durant deux ou trois mois, pour finalement n'avoir qu'une valeur pour ainsi dire nulle après le cinquième mois de conservation.

Il faut noter ici que c'est la saucisse conservée à + 15° qui a vu sa flore atteindre le chiffre le plus élevé.

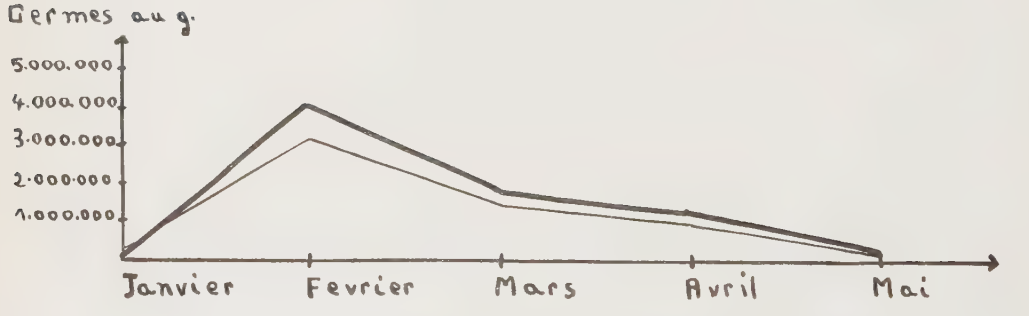
NUMERATION DES GERMES DE LA SAUCISSE DURANT PLUSIEURS MOIS DE CONSERVATION (au gramme)

Différents examens	Germes totaux	"Staphylocoques"	Indologènes	Sulfhydrogènes
SAUCISSE N° I conservée à + 4°				
Janvier (fraîche)	360.000	250.000	10.000	10.000
Février (sèche)	3.250.000	4.200.000	100	1.000
Mars (sèche rance)	1.500.000	1.900.000	100	1.000
Avril (idem)	1.000.000	1.400.000	10	1.000
Mai (idem)	30.000	40.000	10	100
SAUCISSE N° I conservée à + 15°				
Janvier (fraîche)	360.000	250.000	10.000	10.000
Février (sèche)	4.100.000	9.000.000	100	1.000
Mars (sèche-rance)	4.000.000	8.000.000	100	1.000
Avril (idem)	300.000	1.400.000	100	1.000
Mai (idem)	30.000	40.000	10	100
SAUCISSE N° II conservée à + 4°				
Janvier (fraîche)	230.000	80.000	100	1.000
Février (Mauvaise odeur)	500.000	1.400.000	100	1.000
Mars (sèche et mauvaise odeur)	700.000	2.000.000	10	1.000
Avril (meilleure odeur)	300.000	630.000	10	100
Mai (idem)	10.000	20.000	10	100
SAUCISSE N° II conservée à + 15 ° putréfiée en 10 jours				

Variations de la flore totale et "staphylococcique" de la saucisse soumise à un vieillissement



Saucisse N° I conservée à +15°



Saucisse N°I conservée à +4°

Saucisse N°II conservée à +4°

b/ Charcuterie N° II

Le nombre des germes totaux était de 230 000 par gramme dans la saucisse fraîche, il est passé par un maximum de 700 000 deux mois plus tard et a atteint une valeur minimum de 10 000 après 5 mois de conservation à + 4°.

Nous avons également constaté ici une multiplication des germes, mais d'une manière beaucoup moins nette, presque discrète ; quant à la valeur de ceux-ci le cinquième mois, elle était également pour ainsi dire nulle.

- Nous ne pouvons malheureusement pas donner les résultats relatifs à l'échantillon conservé à + 15°, celui-ci, en effet a dû être détruit, car il était en pleine putréfaction après 10 jours de conservation.

II/ *Variation de la flore "staphylococcique"*

a/ Charcuterie N° I

Leur nombre était de 250 000 dans la saucisse fraîche, il est passé par un maximum de 4 200 000 pour la saucisse conservée à + 4° et de 9 000 000 pour celle conservée à + 15°, après un mois de conservation.

Les valeurs respectives de la flore "staphylococcique" dans les échantillons durant les quatre mois suivants subira les mêmes variations que celles de la flore totale, mais à cette différence près qu'elles seront beaucoup plus élevées. En effet, paradoxalement, à ce que l'on devrait trouver, la flore "staphylococcique" s'est révélé avoir des valeurs supérieures du double ou du triple à celles de la flore totale au cours des numérations précédentes.

Nous avions déjà constaté, lors de la numération de celle-ci dans les saucisses fraîches qu'elle s'était révélée supérieure à celle de la flore totale dans trois échantillons et légèrement inférieure à celle-ci tout au long de nos autres examens ; en conséquence, nous avons recherché à éliminer l'erreur commise lors de la numération ou celle dûe à un mauvais ensemencement ou à une dilution imparfaite.

- L'erreur dûe à une mauvaise numération doit être éliminée, car elle ne peut porter que sur un pourcentage négligeable de colonies, de plus elle pourrait conditionner aussi bien des erreurs par excès que des erreurs par défaut, et enfin, elle a été réduite au minimu,un seul opérateur faisant la lecture de toutes les boîtes de Pétri.

- Quant à celle pouvant provenir d'une dilution imparfaite lors de l'ensemencement, elle doit être également rejetée pour les raisons suivantes :

- Les ensemencements pour la numération des germes totaux et des "staphylocoques" sont effectués à partir de la même dilution et dans des conditions identiques (pipette stérile changée pour chaque ensemencement et à chaque dilution).

- Nos numérations ont été faites à partir de la boîte de Pétri ensemencée à partir de la dilution au millième, mais ces résultats étaient comparés chaque fois à ceux des dilutions supérieures, et les chiffres obtenus étaient toujours à peu près identiques.

- Une absence de décalage net entre les valeurs de la flore totale et les valeurs de la flore "staphylococcique" a été une constatation constante au cours de toutes nos expériences.

- De plus, dans l'étude de la variation de la flore d'un même échantillon de saucisse dans le temps, nous avons constaté que le nombre des "staphylocoques" atteignait des valeurs de l'ordre de 8 - 9 000 000 pour 4 000 000 de germes totaux ou de 2 000 000 pour 700 000 germes totaux.

- En conclusion, nous ne pouvons donc pas expliquer cette série de constatations, en invoquant des erreurs de détail dans la technique ou dans l'interprétation des résultats, qui auraient d'ailleurs dû se révéler au cours de nos expériences successives ; nous sommes donc contraints d'émettre certaines hypothèses susceptibles de les expliquer.

Toutes les causes d'erreurs étant éliminées, le fait que les germes et en particulier que les "staphylocoques" ne cultivent pas tous sur la gélose, semble être dû au fait que ce milieu est moins riche et moins nutritif que celui de Chapman ; nous pouvons également penser que les "staphylocoques" rencontrés dans la saucisse serait presque exclusivement des germes chlorurophiles ne se développant que sur milieu hypersalé, en l'occurrence celui de Chapman.

Il y aurait certes, peut-être d'autres hypothèses susceptibles d'expliquer cet état de fait, mais il faut

remarquer que celles-ci sont capables - à elles seules - d'apporter une justification à nos résultats.

Nous déplorons que des incidents regrettables nous aient empêché de conduire nos investigations dans ce sens.

b/ Charcuterie N° II

La saucisse fraîche renfermait 80 000 "staphylocoques" au gramme ; le nombre de ceux-ci est passé par un maximum de deux millions après deux mois de conservation, pour finalement décroître jusqu'à 20 000 après cinq mois au frigorifique à + 4° C.

Le nombre des "staphylocoques" est ici aussi, bien supérieur à celui des germes totaux correspondants, quant aux variations numériques des deux flores, elles ont toujours été observées dans le même sens.

La saucisse placée à + 15°, comme nous l'avons dit plus haut, a dû, par suite de putréfaction après 10 jours, être éliminée.

III/ *Variation des Indologènes et des Sulfhydrogènes*

a/ Charcuterie N° I

Leur valeur était de 10 000 lors du premier examen, mais celle-ci a constamment diminué durant leur conservation à + 4° ou à + 15° C., et, après 5 mois, il ne serait que 10 indologènes et 100 sulfhydrogènes au gramme dans chaque échantillon de saucisse.

b/ Charcuterie N° II

Les chiffres respectifs de ceux-ci dans la saucisse fraîche étaient de l'ordre de 100 et de 1000 au gramme, et, ils ont subi les mêmes variations que dans le produit précédent.

- En conclusion, il est curieux de constater la dissociation très nette qui existe entre la destinée de la flore "staphylococcique" et celle des indologènes et des sulfhydrogènes dans chacun de nos échantillons, en effet, la valeur de ces derniers a constamment diminué durant la conservation alors que celle de la flore "staphylococcique" s'est révélée dans tous les cas 10 à 25 fois supérieure après deux mois de conservation.

Or ces deux propriétés, production d'indol et d'hydrogène sulfuré, reflètent en général deux aspects d'un

même germe. Les "staphylocoques", pour leur compte, produisent très rarement ces deux corps, qui sont l'apanage d'autres germes cultivant très bien sur gélose. C'est pourquoi, le fait que la valeur de la flore totale ait été souvent inférieure à celle de la flore "staphylococcique", associé au fait que les indologènes et les sulfhydrogènes ne recoupent pas la flore "staphylococcique", semblerait démontrer que les germes totaux ayant cultivé sur gélose ne seraient que le reflet d'une faible partie de cette dernière, contenue dans la saucisse.

- Nous en arrivons donc à conclure que la flore totale réelle doit être en majorité constituée par des "staphylocoques".

Par ailleurs, chaque échantillon, nous a permis de constater l'augmentation considérable des "staphylocoques" durant le premier mois de conservation, aussi bien à + 15° C. qu'à + 4°, et la stérilisation presque complète de celui-ci après le cinquième mois, dans les deux cas également.

Les "staphylocoques" de ces saucisses se sont donc développés aussi bien à + 15° qu'au frigorifique ; on est en droit de penser qu'il s'agit de germes cryophiles,seuls susceptibles de se multiplier à des températures de cet ordre.

Nous n'avons pas pu malheureusement élucider la génèse de ces faits, ni leur portée exacte ; cela serait pourtant précieux à connaître, tant dans le domaine de l'inspection que dans celui de la fabrication de ces produits.

- Nous avons également étudié le pouvoir pathogène de nombreuses souches de "staphylocoques" isolés à chaque examen ; nous ne représenterons pas nos résultats sur un tableau car ceux-ci sont, à quelque nuance près identiques les uns aux autres. Les souches avaient en effet toutes les caractères suivants :

Mannitol	+
Pigment	-
Coagulase	-
Hémolyse	-
Gélatinolyse	-
Pouvoir dermonécrotique	-

- En résumé, tous les "staphylocoques" rencontrés dans les saucisses étaient des germes non pathogènes ; de plus leurs propriétés enzymatiques et biochimiques se sont révélées très stables au cours des cinq mois de conservation à différentes températures dans les trois échantillons de saucisse.

- Quant à la culture sur milieu synthétique spécial, elle s'est révélée négative, et, la transformation des nitrates en nitrites comme une propriété quasi constante.

III - APPRECIATIONS ET CONCLUSIONS

A/ *ETUDE COMPAREE DES MILIEUX SELECTIFS DU "STAPHYLOCOQUE" ET DES TECHNIQUES DE CARACTERISATION DE SON POUVOIR PATHOGENE*

1/ *Milieux sélectifs*

Les numérations effectuées sur les trois milieux "Difco" nous ont montré que le milieu de Chapman était le plus intéressant. En effet, pour un même échantillon, non seulement le nombre de colonies qu'il révèle est en moyenne supérieur à celui obtenu sur les autres milieux, mais encore le nombre de colonies luxuriantes y est plus important.

Nous avons reporté à cet effet dans un tableau les 18 dernières numérations effectuées. On peut constater que le milieu de Chapman est indubitablement celui sur lequel cultivent le maximum de colonies, le "Bacto Chapman Stone Medium N° 110" vient ensuite, quant au "Bacto Staphylococcus Medium", il nous a fourni des résultats très variables et s'est révélé être le milieu le moins valable.

Nous retiendrons donc que le milieu de Chapman nous a pleinement satisfait pour l'isolement des "staphylocoques", tant pour le nombre important de colonies qui cultivent sur lui, que pour la grosseur de ces dernières ; quant aux deux autres milieux, ils se sont révélés nettement moins aptes à remplir ces deux conditions et de plus leur lecture était beaucoup plus difficile.

2/ *Les Techniques*

a/ Etude de la production de pigment

La chromogénèse a été observée sur un nombre très restreint de colonies au cours de nos différents examens; les "staphylocoques" blancs représentaient en effet la majorité de ceux découverts dans les saucisses ; quant aux quatre colonies pigmentées isolées sur les milieux "Difco", elles se sont révélées être des souches non pathogènes.

ETUDE COMPAREE DES MILIEUX SELECTIFS des "STAPHYLOCOQUES"

Milieu de Chapman	"Chapman Stone Medium" (Difco)	"Chapman Staphylococcus Medium" (Difco)
9.000.000	7.000.000	6.000.000
8.000.000	7.200.000	7.000.000
4.200.000	4.000.000	3.200.000
2.000.000	1.400.000	1.500.000
1.900.000	1.000.000	900.000
1.400.000	900.000	1.100.000
1.400.000	850.000	800.000
1.100.000	1.000.000	880.000
630.000	450.000	400.000
350.000	340.000	280.000
340.000	290.000	280.000
250.000	180.000	190.000
200.000	190.000	180.000
180.000	160.000	140.000
160.000	160.000	140.000
130.000	130.000	125.000
120.000	115.000	80.000
80.000	75.000	65.000
70.000	65.000	60.000

Il nous a été donné de constater que des colonies blanches, obtenues après 48 heures d'étuve sur le "Bacto Chapman Stone Medium" et sur le "Bacto Staphylococcus Medium", étaient capables, après cinq jours à la température du laboratoire, d'acquérir une pigmentation ; bien que le mode d'emploi de ces milieux nous en dispensât, nous avons tout de même voulu approfondir l'étude de telles colonies.

Nous avons alors ensemencé ces dernières, ainsi qu'un certain nombre d'autres colonies restées blanches, sur le milieu de Chapman pour apprécier leur pouvoir fermentescible du mannitol. Nous avons alors constaté que :

- Sur 37 colonies pigmentées sur le "Bacto Chapman Stone Medium", 36 se sont révélées mannitol + et sur 23 colonies pigmentées sur le "Bacto Staphylococcus Medium", 20 se sont révélées mannitol +.

- Sur 29 colonies blanches isolées sur le premier milieu, 25 se sont révélées mannitol +, et, sur 39 colonies blanches isolées sur le second, 29 se sont révélées mannitol +.

- En conclusion, les quatre colonies pigmentées après 48 heures à l'étuve ont fermenté le mannitol, mais ne se sont pas révélées pathogènes par la suite ; quant aux différentes colonies blanches, après ce même laps de temps à l'étuve, une sur cinq a montré une chromogénèse après cinq jours à 20° C., mais 80 % de celles-ci, indépendamment du milieu sur lequel elles ont été isolées, ou de leur pouvoir de produire du pigment dans les cinq jours suivants, se sont révélées capables de fermenter le mannitol.

Ces mêmes colonies n'ont jamais répondu positivement par la suite aux différents tests de caractérisation du pouvoir pathogène.

b/ Etude de la fermentation du mannitol

La fermentation du mannitol que nous avons longuement expérimentée, s'est révélée nulle dans l'appréciation ou même dans la suspicion du pouvoir pathogène des "staphylocoques" pathogènes. Un nombre imposant de souches, - un trentième de celles isolées - possède en effet cette propriété et toutes à l'exception d'une seule se sont révélées non pathogènes.

Il nous semble bon de rapporter ici que nous avons précédemment vu dans le chapitre II, à savoir que de nombreux auteurs ont trouvé des "staphylocoques" blancs entérotoxiques dans les produits alimentaires.

En conséquence, la considération que l'on a longtemps attribuée à cette propriété en tant que test du pouvoir pathogène, doit être, à notre avis, révisée, et l'on ne devrait même pas la considérer comme un signe de suspicion car elle risque de provoquer de nombreuses erreurs par excès.

c/ Gélatinolyse

Le "Bacto Chapman Stone Medium" utilisé comme milieu sélectif, nous a permis d'effectuer ce test sur un nombre important de colonies, et, cinq de celles-ci seulement se sont révélées avoir cette propriété. Parmi elles, une seule s'est révélée pathogène. Nous ne pouvons donc pas conclure formellement sur la valeur de ce test, car notre expérimentation n'a pas porté sur un nombre suffisant de colonies gélatinolytiques, mais notre opinion corrobore l'avis unanime : ce test ne peut jouer qu'un rôle accessoire dans la suspicion du pouvoir pathogène des "staphylocoques".

d/ Production de la coagulase et des hémolysines
Pouvoir dermonécrotique

Ces différentes propriétés n'ont été observées que chez une seule colonie, qui de ce fait a été la seule considérée comme pathogène, en effet, pour les différents auteurs, ces trois tests seraient spécifiques de ce caractère.

B/ *COMMENTAIRES SUR LA NATURE EXACTE DES "STAPHYLOCOQUES"*

Nous avons jusqu'à maintenant utilisé l'appellation de "staphylocoques" pour désigner les cocci poussant sur Chapman, il nous faut vérifier ce terme et au besoin le commenter.

Travaillant sur la clé du "Bergey's Manual" de 1948 (97), nous avons, par examens bactérioscopiques, acquis la preuve qu'il s'agissait bien de représentants du genre "Micrococcus".

Le caractère aérobie des cultures, l'absence de pigmentation rouge ou rose sur milieu gélosé de la majorité des souches, nous ont conduit à placer les germes en question dans la première partie de la clé de ce genre.

Ultérieurement, nous nous sommes intéressés aux deux caractères "diagnostic" que représentent, pour de tels microorganismes, la transformation des nitrates en nitrites et la culture possible sur un milieu synthétique où le phosphate d'ammonium est la seule source d'azote.

Comme on peut le voir sur le tableau où ces différents tests sont consignés avec ceux de la caractérisation du pouvoir pathogène de nombreuses souches isolées, aucun coccus n'a pu pousser sur un tel milieu synthétique, par contre, pratiquement tous ont réduit les nitrates.

C'est le test de la gélatinolyse qui intervient alors pour finir de caractériser ces souches, et toutes pratiquement se sont révélées inaptes.

Les espèces de Microcoques répondant à ces différents caractères sont "Micrococcus aurianticus" et "Micrococcus epidermis", celles-ci, toujours d'après le "Bergey's Mannual" sont incapables de fermenter le mannitol ; or toutes nos souches possèdent cette propriété, nous arrivons donc à une impasse : la majorité des germes rencontrés s'avère inclassable !

Quant à la souche 25, considérée comme pathogène, elle possède tous les caractères - à l'exception de la réduction des nitrates - de "Micrococcus pyogenes albus".

La nouvelle classification du "Bergey's Mannual" 1958 (142), fait apparaître le genre "Staphylococcus" qui apporte simplement une nomination nouvelle pour "Micrococcus pyogenes aureus", "Micrococcus pyogenes albus" et "Micrococcus citreus".

De plus un nouveau microcoque est apparu, c'est "Micrococcus cryophilus" découvert par Mc Lean en 1951 (141), celui-ci a en effet la propriété exclusive - toujours d'après le "Bergey's Manual" de 1958 - de se développer au-dessous de 8° C. Ses caractères les plus importants sont les suivants : il n'a pas de pigment, il ne fermente pas le mannitol, il n'est pas gélatinolytique, il ne cultive pas sur le milieu synthétique et ne transforme pas les nitrates.

Or dans l'étude de la flore "staphylococcique" d'une saucisse conservée à + 4° nous avons constaté une prolifération intense de cette dernière ; il semblerait donc que ces germes seraient des "Micrococcus cryophilus" : or si ceux-là possédaient les caractères morphologiques de ceux-ci, ils se révélaient être en général mannitol + et réduisaient les nitrates, caractères non superposables à ceux de ce dernier ; il n'en était pas moins vrai, que nous étions en présence d'un microcoque cryophile.

- Quelles conclusions tirer de cette série de constatations ?

Tout en admettant que les appréciations des caractères biologiques doivent toujours être faites avec une certaine souplesse et que l'on ne doit pas prendre un caractère atypique à la lettre, nous pensons cependant pouvoir dire que la clé de classification du "Bergey's Manual" est un peu trop dichotomique, car elle ne nous permet pas toujours de donner une "étiquette" à tous les "staphylocoques" rencontrés.

- En résumé, la seule affirmation qu'il nous est possible d'avancer, est que les "staphylocoques" rencontrés dans les saucisses fraîches étaient des germes non pathogènes du genre "Micrococcus" ; en effet, comme il a été vu précédemment, aucun de ceux-ci ne mérite le qualificatif de pathogène, les critères utilisés (à l'exception de l'inoculation et de l'ingestion), ne vont certes pas tous dans ce sens, mais l'exégèse que nous en avons déjà faite nous permettra de ne pas revenir sur ce sujet.

Il est tout de même curieux que des prélèvements aussi nombreux que les nôtres et tellement étagés dans le temps nous aient montré la continuité d'une telle flore dans des établissements différents. Il aurait été intéres-

sant, pour expliquer ce fait, de rechercher si un facteur commun ne pourrait assurer leur sélection au sein des saucisses. Nous avons pensé à un caractère chlorurophile où à une dépendance chlorurée, mais il nous a malheureusement été matériellement impossible de vérifier cette hypothèse.

C/ *CONCLUSIONS SUR LA FLORE "STAPHYLOCOCCIQUE" DES SAUCISSES*

N'ayant pas d'expérience personnelle valable, nous tenons à confronter nos résultats avec les normes édictées en 1957 par les spécialistes de la technologie carnée que sont Buttiaux et Mossel de l'Institut Pasteur de Lille.

a/ *Normes de qualité bactériologique* (143)

Elles poursuivent deux buts distincts pour chaque aliment :

1/ Celui, essentiel, de l'absence totale de pouvoir virulent et toxinigène pour l'homme et éventuellement pour les animaux domestiques, de toutes les substances alimentaires, avec cependant des différences dépendant des possibilités de survie des bactéries virulentes ou toxinigènes, des virus et parasites dans le produit considéré (144).

2/ Celui de la qualité marchande et surtout de la stabilité. Elles varient avec la nature du produit envisagé, la qualité initiale des matières premières constituantes, le mode de préparation et de stockage ... (145).

Les normes doivent être :

1/ Quantitativement limitées.

On ne doit plus employer l'expression "absence de germes pathogènes" sans préciser dans quelle quantité de produit leur recherche est possible dans les conditions actuelles et en tout cas dans quelle quantité elle est recommandée. On dira par exemple "pas de Salmonella dans 20 grammes". De même pour le dénombrement des bactéries on homologuera un volume au poids de substance où il doit être estimé ; on dira, par exemple, "moins de cent par gramme".

2/ Elles doivent être spécifiques.

On ne dira pas "absence de bactéries pathogènes" ; on précisera celles devant ou pouvant être recherchées. Il paraît difficile par exemple, en ce moment d'exiger qu'un aliment soit exempt d'entérotoxine "staphylococcique" puisqu'aucune méthode simple et sûre n'est capable de la dépister.

3/ En outre, les normes doivent correspondre à un optimum accessible.

En effet, dans certains cas, des tolérances sont acceptables si le produit s'avère non dangereux et si les ma-

tières premières et les procédés de fabrication, manipulation, emballage et stockage, sont suffisamment satisfaisants . En d'autres termes, les normes doivent être adaptées à chaque produit alimentaire distinct, aux meilleures possibilités d'obtention (146). Mais lorsque les normes ne peuvent pas être obtenues en pratique, celles-ci sont inutiles et même dangereuses car elles favorisent les fraudes ; en effet, des prétentions d'hygiène inaccessibles peuvent inciter les producteurs à additionner les aliments d'antiseptiques toxiques comme les dérivés de l'acide bromacétique (147) ou les dérivés phényl-mercuriques (148).

Nous allons maintenant envisager les normes pour les produits périssables nus tels que les saucisses.

1/ Absence de microbes pathogènes ("entérobactériaceae" ; "Mycobacterium tuberculosis" ; "Brucella" ; "Corynebacterium diphteriae" ; "Streptococcus pyogenes" ; "Listeria") dans 25 g. pour les Salmonella et Entérobactéries pouvant subir un enrichissement dans un milieu liquide ; dans un gramme au moins pour les autres.

2/ Absence de bactéries toxinigènes ("Cl. botulinum", "Cl. perfringens" toxigènes, "Staphylococcus aureus" possédant une coagulase), spores de "Cl. botulinum" et "Cl. perfringens" toxinigènes dans 5 grammes, "Staphylococcus aureus" dans 0,1 g.

3/ Absence de toxine botulinique

4/ Absence de germes tests de contaminations fécales.

5/ Absence d'"Escherichеae" (autres que E. coli) et autres "entérobactériaceae" (149) dans 0,1 g. des produits pasteurisés ou chauffés.

6/ Le nombre des bactéries aérobies et anaérobies revivifiables dans un gramme de produit ne doit pas dépasser 100 000.

Nous entendrons ainsi le nombre de colonies qui se développent sur des milieux solides appropriés. Il faut savoir, en effet, qu'une colonie ne provient pas toujours de la multiplication d'une seule cellule microbienne, plusieurs d'entre elles réunies au même point par suite de leur disposition naturelle ("staphylocoques" par exemple), par insuffisance d'homogénéisation ou par hasard, donneront une seule colonie (150).

7./ Enfin, absence de produits antiseptiques ajoutés frauduleusement.

Il est loisible de constater la pauvreté des normes de qualité bactériologique en ce qui concerne le "staphylocoque" et de plus la valeur de celles-ci n'a pas été adaptée à chaque produit alimentaire ; elles ne pourront donc que nous donner un ordre d'idée de la valeur maximum du nombre de germes au gramme à ne pas dépasser et de l'absence de "Staphylococcus aureus", ce dernier se révélant en effet très souvent entérotoxique.

b/ *Appréciations sur les saucisses testées*

1/ "Staphylocoques" pathogènes

Les normes bactériologiques des produits alimentaires périssables nus, stipulent que l'on ne devrait pas y rencontrer plus de 10 "Staphylococcus aureus" par gramme ; au cours de nos différents examens de saucisse, nous avons isolé un nombre de colonies mannitol + considérable par gramme mais ceci ne tire pas à conséquence car ce n'est pas à nos yeux du moins - et nous avons dit pourquoi - un test de caractérisation du pouvoir pathogène. Il en est de même pour les recherches de la gélatinolyse et de la pigmentation. Une seule souche, sur des examens poursuivis durant deux années et demie, a revêtu vraiment le caractère d'une souche pathogène.

- Les saucisses que nous avons examinées répondaient donc bien aux normes, en ce qui concerne la présence de "staphylocoques" pathogènes.

2/ Flore totale au gramme.

Le chiffre moyen est de 400 000 et les chiffres maxima sont de l'ordre de 800 000 à 850 000 ; nous avons donc des valeurs nettement supérieures à celles que, d'après Buttiaux et Mossel de l'Institut Pasteur de Lille, ne doit pas dépasser un produit périssable nu, sous peine de devenir dangereux (100 000).

Or notre expérimentation nous a révélé que des saucisses fraîches renfermant près de 1 000 000 de germes au gramme pouvaient ne pas être nocives.

Mais nous nous garderons bien de généraliser cette constatation et d'en tirer des constatations adaptables à un autre produit que celui de notre étude. Il est ainsi des

cas d'espèce, dont on ne peut nier l'existence ... Mais l'opinion de Buttiaux limitant à 100 000 germes la flore totale acceptable est pleinement justifiée par le souci de livrer à la consommation une marchandise alibile préparée dans les conditions d'hygiène indispensable.

3/ Indologènes et Sulfhydrogènes au gramme

Il n'y a jamais eu de normes établies pour les saucisses, comme ceci a été fait pour le lait. Est-ce à dire qu'une certaine tolérance serait admise !

Au cours de nos expériences nous avons rencontré une moyenne de 5 000 germes ayant ces propriétés respectives et le chiffre indiquant la présence d'au moins 10 000 germes au gramme était courant.

Les chiffres paraissent tout de même élevés, et semblent traduire des manipulations accomplies dans des conditions sinon répréhensibles du moins peu orthodoxes.

D/ *CONCLUSIONS GENERALES*

- Le "Bacto Chapman Medium" nous est apparu comme le meilleur milieu sélectif pour les "staphylocoques". Les colonies qui s'y développent sont en effet plus nombreuses et plus luxuriantes par rapport à celles des deux autres milieux "Difco".
- La gélose nous est apparue comme un milieu imparfait pour la culture des "Staphylocoques" ; une grande partie des souches en effet ne peuvent pas s'y développer.
- La chromogénèse est d'une valeur incertaine sinon nulle.
- La fermentation du mannitol s'est avérée comme une propriété ne pouvant pas être retenue dans l'appréciation ou la suspicion du pouvoir pathogène.
- La gélatinolyse ne possède qu'une valeur contingente.
- Quant à la production de la coagulase et des hémolysines, ainsi qu'au pouvoir dermonécrotique, nous n'avons pas pu nous faire une opinion sur leurs valeurs respectives, étant donné qu'une seule colonie s'est révélée positive à ces différents tests.
- La classification des "staphylocoques" rencontrés selon la clé de détermination du "Bergey's Manual", nous est apparue très difficile, pour ne pas dire impossible, à cause du caractère dichotomique poussé à l'extrême de cette même classification en fonction des différents caractères culturaux et biochimiques des germes.
- Quant à l'étude de la flore microbienne de la saucisse elle nous a révélé que celle-ci était en grande partie constituée par des "staphylocoques" non pathogènes du genre "Micrococcus".
- La valeur de la flore totale, s'est révélée être de l'ordre de 1 000 000 dans de nombreuses saucisses fraîches, sans pour cela provoquer de troubles parmi les consommateurs : il ne nous paraît pas possible, à la lumière de ce travail sur la flore des saucisses, d'apporter quelques précisions nouvelles, utiles à l'inspection de ces produits. Tout au contraire, nos résultats semblent devoir élargir le champ des difficultés qui s'imposent à l'homme de laboratoire, à savoir :

- une flore quantitativement trop importante
- constituée par des "staphylocoques" non pathogènes
- en présence d'un test de Chapman habituellement positif, le tout, dans un produit dont la sapidité et la valeur hygiénique ont paru normales.

Nous terminerons ce travail en espérant tout d'abord que nos propres résultats seront vérifiés dans un avenir proche et en souhaitant que des travaux ultérieurs plus poussés apporteront quelques précisions et quelques éclaircissements dans le domaine de la bactériologie alimentaire appliquée à chaque produit.

BIBLIOGRAPHIE

1 - Food poisoning in England and Wales 1954 - *Monthly Bull. Minist. Health and Public Health Labo. Serv.*, 1954, **14**, 203.

2 - Food poisoning in England and Wales 1955 - Même réf. 1954, 1955, **15**, 263.

3 - DENYS, *Bull. Acad. Royale Med. Belgique*, 1894, **8**, 605.

4 - OWEN, *Physician and Surgeon*, 1907, **29**, 289.

5 - COSTA MANDRY, *Puerto Rico Journ. Health Prop. Med.* **9**, 1939, 49.

6 - V.C. TIPTON & D.F. SMILEY, *U.S. Navy Med. Bull.*, **41**, 1943, 565.

7 - *Medical Research Council Monthly Bull. Emergency, Publ. Health Lab. Sc.*, 1943, **2**, 71.

8 - *Slater, Am. J. Publ. Health*, 1944, **34**, n° 8, 854.

9 - W.J. SCOTT & D.F. STEWART, *Med. F. Aust.*, 1943, **11**, 211.

10 - MONAL, *Brit. Med. Journ.*, 1944, **4**, 382.

11 - G.M. DACK, Y.W. BOWMAN & R.N. HARGER, *J. Am. Med. Ass.*, 1935, **105**, 1598.

12 - V. MONACCI & F. VIVOLI, *Bull. Soc. It. Biol. Specim.*, **25**, 1949, 1432.

13 - M.A. BARBER, *Philip, J. Soc.*, **9**, 1914, 515.

14 - GEIGER, CROWLEY & GRAY, *J. Am. Med.*, **105**, 1935, 1980.

15 - *J. Am. Med. Ass.*, 1935, 529.

16 - Oscar FELSENFELD, *Revue d'hygiène*, 1938, **60**, 533.

17 - M. ACQUARONE, E. LIECH, *Riv. Clin. Med.*, **40**, 1939, 532.

18 - J.F. HACKLER, *Am. J. Publ. Health*, **29**, 1939, 1247.

19 - DEROBERT, TRUFFET & NAVELLIER, *Ann. Med. Légale*, Sept. Déc. 1944, 12, N° 9.

20 - BLANCHARD & THIEULIN, *Bull. Acad. Med.*, 1946, **130**, 37.

21 - N. NESTORESCO, M. POPOVICI, N. ROMAN, D. VOICO, I. GUTU & GH. CAZAREANU, *Archives roumaines de Patho. exper. & de microbiologie*, 1959, **18**, 223 - 226.

22 - CASTLINE & THOMPSON, *J. Bact.*, **33**, 1937, 50.

23 - *J. Am. Med. Ass.*, **109**, 1937, 1994.

24 - J. PIKKARAINEN, *Zentralhi Bakt.*, I, **143**, 1938, 60.

25 - COGSWELL, KUHN & KILBOURNE, *Canad. Publ. Health.*, J., **29**, 1938, 333.

26 - BAM, *Mikrob. Epidem. i. Imm., Moscou,* **2**, 1942, 91-94.

27 - Paul de LAY, *Bull. U.S. Arm. Depart.*, 1944, n° 71-72.

28 - F.C. WILLIAMS, S. SWIFT, R.L. WALLEM & F.C. WILSON, *Month. Bull. Med. Conn.*, **5**, 1946, 17.

29 - T. ROSATI, *Zooprofilassi,* **6**, 1951, n° 1.

30 - J.M. RITCHIE, D.L. MURRAY & M. HOLGATE, *Lancet,* **253**, 1947, 256.

31 - MONACCI, GIOVANARDI, 1950, cités par T. Rosati, 3ème réunion scientifique, Milan, 14,15 Avril 1951.

32 - HUET, *Arch. Inst. Past. Tunis,* 1957, **34**, 473 - 475.

33 - SUZZI-VALLI, *Riv. Ital. d'Igiene,* 1945, 226.

34 - V. MONACCI & L. CRISPINO, *Bull. Soc. It. Biol. Specim.*, **25**, 1949, 1430.

35 - M. MITROVIC, 3ème Congrès de la Soc. des Sc. Veter. Senigallia., Sept. 1949.

36 - A. MOROZZI, *Soc. Ital. del Sc. Veter.*, **4**, 1950, 1.

37 - J. BOYER, L. CORRE, P. MERCIER, J. PILLET & M. TISSIER, *Presse médicale,* **59**, 1951, 1260 ; *Bull. Acad. Med.*, **115**, 1951, 308.

38 - J. GADRAT, J. QUERCY & BES, *Soc. Med. Toulouse,* 25 Janv. 1955.

39 - W.A. TIMMERMAN, *Medort. Tijaschr. v. Geneesh,* **3**, 1937, 765.

40 - F.C. MINETT, *J.Hyg.*, 1938, **38**, 624.

41 - F.G. ODDY & H.W. CLERG, *Brit. Med. Journ.*, 5 av. 1947, 442.

42 - F.A. BEALN, *Lancet,* **252**, 1947, 1.

43 - L. TASSI & E. IGNESTI, *Zooprofilassi,* Avril 1951, 152.

44 - A. NEVOT, G. BREVOT, J. PANTALEON & R. ROSSET, *Bull. Acad. Vet.*, **24**, 1951, 151 ; *Bull. Acad. Med.*, **115**, 1951, 324.

45 - Remo COPPINI, *Revista di Medicina Veter. e Zoot.*, 1952, n° 3 et 4.

46 - GIANELLI F. - *Arch. Veter. Ital.*, 1952, **3**, 311-315.

47 - N.A. NELSON, *New England S. Med.*, 1928, **199**, 1145.

48 - E.O. JORDAN, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1930, **27**, 741 ; *J. Am. Med. Ass.*, **97**, 1931, 1704.

49 - F.W. TANNER & R.J. RAMSEY, *Am. J. Med. Sc.*, **80**, 1932, 184.

50 - R. Mc. BURNEY, *J. Am. Med. Ass.*, **100**, 1933, 1999.

51 - J.A. CRABTREE & W. LITTERER, *Am. J. Publ. Health,* **24**, 1934, 1116.

52 - JORDAN & W. BURROWS, *J. Inf. Dis.*, **57**, 1935, 121.

53 - SHAUGNESSY, J.C. GRUBB, *J. Inf. Dis.*, **58**, 1936, 318.

54 - J.C. GEIGER, *Publ. Health Rep.*, **52**, 1937, 765.

55 - P. MAJORS & Coll., *J. Bact.*, **35**, 1938, 72.

56 - CAUDILL & HUMPHREY, *Kentucky*, 1939, 373.

57 - E.M. WADE, *U.S. Navy Med. Bull.*, **36**, 1938, 306.

58 - R.J. WILSON, *Canad. Publ. Health Journ.*, **29**, 1938, 833.

59 - A. GIOVANARDI & STOPPA, G. ATTI, *R. Acad. Fisiovritica in Siena*, **7**, 1939, n° 2, 44.

60 - LANSON, *J. Bact.*, 1945, **49**, 110.

61 - CALMETTE & PETIT, *C.R. Soc. Biol.*, 26 janv. 1907, 169.

62 - G.M. DACK, W.E. CARY, O. WOOLPERT & H. WIGGERS, *J. Prev. Med.*, **4**, 1930, 167 ; *New-York Health News*, oct. 1930.

63 - SEWIT, *J. Hyg.*, 1945, **44**, n° 1, 37-52.

64 - GERNEZ, RIEUX, BUTTIAUX & Mlle BROGNIART, *Presse Medicale*, 30 Août 1947.

65 - CONYBEARE, *Cit. da Tron in Prag. Medico.*, **6**, 1950, 112.

66 - M. FEIG, *Am. J. of. Publ. Health*, **40**, 1950, 1372.

67 - M. ASDRUBALI, *Arch. Vet. Ital.*, 1951, **n° 2**, fasc. 1.

68 - T. ROSATI, *Arm. del Sanita Pub.*, **10**, 1949, 756.

69 - A. CECCARELLI & F. del FRANCIA, *Zooprofilassi*, **7**, 1932, 359.

70 - R. RICHOU, J. PANTALEON, J. BILLON & M. CAZAILLET, *Revue d'Immunologie*, T. XXIII, n° 1-2 Janv.-Mars 1959, 32.

71 - E. SUZZI-VALLI, *Riv. Ital. Igiene*, **45**, 1945, 226.

72 - M. MITORVIC, *Arch. Vet. Ital.*, **1**, 1950, 121.

73 - DOLMAN, *J. Inf. Dis.*, **55**, 1934, 172.

74 - F.C. KELLY & G.M. DACK, *Am. J. Publ. Health*, 1936, **26**, 1077.

75 - R.V. Stone, *Zbl. f. Bact.*, 1936, **122**, 8.

76 - C. BERARDUCCI & PALAZZETTI, *Rev. di Med. Veter. et Zootec.*, **1**, 1949, 452.

77 - J. DUMAS, J. POCHON, A.R. PREVOT, *Bactériologie Médicale*, 1958, p. 299.

78 - J. BOYER, P. MERCIER, J. PILLET, M. TISSIER, *Presse Medicale*, 29 Sept. 1951, 59, n° 61.

79 - R. BUTTIAUX & D.A.A. MOSSEL, *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1957, **9**, 145.

80 - P. SAURAT, R. LAUTIE, F. LESCURE, *Revue de Médecine Vétérinaire, Lyon, Toulouse*, nov. 1959.

81 - FELSEN & W. WOLARSKY, Epidemic diarrhea of the New-born - *Archives of Pediatries*, New-York, avril 1952, **59**, 495, 512.

82 - R. TURPIN, J. PILLET & Mme PILLET, *Société de Pédiatrie de l'Est*, 7 Juil. 1953.

83 - CATHALA : mêmes réf.

84 - R. MINCK, Mme GALLERON, A. KIRN & D. WILLARD, *Extrait de Strasbourg Médical*, mai 1956, n° 5, p. 335-337.

85 - A. NEVOT, *Bull. Acad. Med.*, 8 mars 1949 & 18 avril 1950.

86 - P. MERCIER & Coll., *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 565.

87 - R. RICHOU & R. KOURILSKY & Mme R. RICHOU, *C.R. Soc. Biol.*, avril 1953.

88 - G.S. WILSON, *J. Appl. Bact.*, 1955, **18**, 629.

89 - H. EYER, *Ernährungswirtschaft* 1957, **4**, 169.

90 - R. BUTTIAUX, A. BRETON & B. GAUDIER, *Archives françaises de Pédiatrie* 1956, **13**, 543.

91 - THATCHER F.S., *J. Appl. Bact. 1955*, **18**, 449.

92 - D.A.A. MOSSEL, A.S. DE BRUIN & VAN DIEPEN H.M.J., *J. Appl. Bact.* 1957, **20**, 265.

93 - D.A.A. MOSSEL & VAN DIEPEN H.M.J., *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1956, **8**, 132.

94 - L.A. ALLEN, M.A.F. PIERCE & H.M. SMITH., *J. Hyg. 1953*, **51**, 458.

95 - R. BUTTIAUX, *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1957, **9**, 176.

96 - South African Bureau of Standards - *"Code of Practice for Food Hygiène"* Pretoria 1956.

97 - Robert S. Breed, E.G.D. MURRAY, A. PARKER HITCHENS, *Bergey's Manual of Determination Bacteriology*, 6th. édition, 1948, 235.

98 - DOLMAN & WILSON, *J. Immunology*, **35**, 1938, 13.

99 - CHAPMAN, BEREUS, *J. Bact.*, 1935, **29**, 437.

100 - RICHOU, *Revue de Patho. Gen. Comparée*, 1953.

101 - P. GORET, *Extrait des Archives Belges de Médecine Sociale, Hygiène, Médecine du Travail & Médecine légale*, janv. 1959, n° 1, 74.

102 - E.S. DUTHIE, *J. Gen. Microbiol.*, 1955, **13**, 383.

103 - R. BUTTIAUX, D.A.A. MOSSEL, *Ann. Inst. Pasteur Lille* 1957, **9**, 159.

104 - R.R. MADISON, Fibrinolytic Staphylococci, *Proc. Soc. Exp. Biol. a Med.*, T. XXXV, nov. 1935, p. 209.

105 - R. RICHOU, *Revue de Patho. Gen. & Comp.* 1953, **646**, 368.

106 - R. RICHOU, *Rev. de Patho. Gen & Comparée*, 1953, **645**, 178.

107 - A. NEVOT, J. PANTALEON & R. ROSSET, *Bull. Acad. Med.*, 1951, **115**, 324.

108 - SCHWARTZ, thèse Médecine Paris, 1938.

109 - R. RICHOU, *Bull. Acad. Med.*, 1958, **6**, 7199.

110 - R. RICHOU, J. PANTALEON, J. BILLON & M. CAZAILLET, *Revue d'Immunologie*, T. XXIII, n° 1-2, janv.-mars 1959, 33.

111 - DOLMAN, *J. Immunology* 1938, **35**, 13.

112 - DACK, CAY & WOOLPERT, *J. Prev. Med.*, **4**, 1930, 167.

113 - CAUDILL & HUMPHREY, *Kentucky*, 1939, 373.

114 - O.C. WOOLPERT & G.M. DACK, *J. Inf. Dis.*, **52**, 1933, 6.

115 - M.J. SURGALLA & K.L. HITTE, *J. Inf. Dis.*, **76**, 1945, 78.

116 - A. JORDAN, DACK & WOOLPERT, *J. Prev. Med.*, **5**, 1931, 383.

117 - B. DAVIDSON, DACK & CARY, *J. Inf. Dis.*, **62**, 1938, 219.

118 - MINETT, *J. Hyg.*, **38**, 1938, 623.

119 - DAVIDSON & DACK, *J. Inf. Dis.*, **64**, 1939, 302.

120 - DACK, CARY, WOOLPERT, ORAM & WIGGERS, *J. Prev. Med.*, 1930, **4**, 167 ; *J. of Bact.*, **33**, 1937, 59.

121 - *J. Am. Med. Ass.*, 1935, 1332.

122 - JORDAN & coll., *J. Prev. Med.*, **5**, 1931, 387 ; *J. Am. Med. Ass.*, **94**, 1930, 1648.

123 - A. CORPENING & E.P. FOXHALL, *Am. Journ. Publ. Health*, 1935, **25**, 938.

124 - CRABTREE & W. LITTERER, *Am. J. Publ. Health*, **24**, 1934, 1116.

125 - JORDAN & BROWN, *Proc. Soc. Exp. Biol. a Med.*, **29**, 1931, 161.

126 - BORTHWICK, *Brit. J. Exp. Path.*, **14**, 1933, 236.

127 - WOOLPERT & DACK, *J. Inf. Dis.*, **52**, 1933, 6.

128 - HUNTER & DACK, *J. Inf. Dis.*, **63**, 1938, 346.

129 - RAMSAY & TRACY, *Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.*, **28**, 1931, 390.

130 - DOLMAN, *Canad. Publ. Health Journ.*, **27**, 1936, 489 ; *J. Immun.* **35**, 1938, 13.

131 - SURGALLA & MICHAEL, *Proc. Soc. Exp. Biol. A. Med.*, **244**, 1946, 244.

132 - DOLMAN & WILSON, *Canad. Publ. Health Journ.*, **81**, 1940, 68.

133 - MYLVARD BAYLISS, *Canad. Publ. Health Journ.*, **27**, 1936, 489 ; *J. Immun.*, **35**, 1938, 13.

134 - W.M. HAMMON, *Amer. Journ. Publ. Health.*, 1941, **31**, 1191.

135 - D.L. HUSSEMANN & E.W. TANNER, *Food Res. III.*, **14**, 1949, 91 ; *Abst. in Bull. Hyg. London*, 24, 795.

136 - R. RICHOU, J. PANTALEON, J. BILLON & M. CAZAILLET, *Revue d'Immunologie*, T. XXIII, n° 1-2, Janv.-Mars 1959, 33.

137 - E.D. ROBINTON, *Proc. Soc. Exp. Biol. A. Med.*, 1949, 72, **265**.

138 - *Difco Manual of Deshydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures*, 9th. édition, 1953, 150.

139 - Même référence, 151.

140 - Même référence, 153.

141 - Mc LEAN, SULZBACKER AND MUDD, *J. Bact.*, **62**, 1951, 723.

142 - *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, by Robert S. Breed, E.G.D. Murray, Nathan R. Smith, 7th édition 1958, 454.

143 - R. BUTTIAUX & D.A.A. MOSSEL, *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1957, **9**, 143.

144 - F.B. ENGLEY, *Texas Rep. Biol. Med.*, 1956, **14**, 313.

145 - D.A.A. MOSSEL & M. INGRAM, *J. Appl. Bact.*, 1955, **18**, 232.

146 - J.G. DAVIS, *Atti VI Congres. Internat. Microbiol.*, 1953, **7**, 290.

147 - Z.M. BACQ, R. CHARLIER & A. KLUTZ, *Bull. Acad. Royale Med. Belgique*, 1951, **16**, 212.

148 - O.G. FITZHUGH, A.A. NELSON, E.P. LAUG & F.M. KUNZE, *Arch. Ind. Hyg. Occup. Med.*, 1950, **2**, 433.

149 - F. KAUFFMANN, *Zentralbl. Bakteriol. Abt. I*, Orig., 1956, **165**, 344.

150 - B.C. HOBBS, *Atti VI Congres Internat. Microbiol.*, 1953, **7**, 280.

Vu : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur,

SAURAT

Vu : Le Directeur de
l'Ecole Vétérinaire

P. PONS

Vu : Le Président de la Thèse

ANDRIEU

Vu : Le Doyen

LAZORTHES

Vu et Permis d'Imprimer
Toulouse, le 10 Février 1961
Le RECTEUR,
Président du Conseil de l'Université

DOTTIN

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
CHAPITRE I - Les intoxications alimentaires à "Staphylocoques"	4
I°) Historique - Fréquence	4
II°) Etiologie	11
III°) Symptômes	16
IV°) Diagnostic	18
V°) Pathogénie	21
VI°) Prophylaxie	23
CHAPITRE II - L'agent responsable : le "Staphylocoque"	26
I°) Classification	26
II°) Mise en évidence du pouvoir pathogène d'un "staphylocoque"	28
1°) Tests Indirects du pouvoir pathogène in vitro	28
a) Chromogénèse	28
b) Propriétés biochimiques	31
c) Toxicogénèse in vitro : Hémolysines	34
2°) Tests Directs du pouvoir pathogène in vivo	36
a) Pouvoir dermonécrotique sur le lapin	36
b) Mise en évidence de l'entérotoxine	37
III°) Conclusions	40
CHAPITRE III - Recherches personnelles	41
I°) Techniques employées	43
A) Les milieux d'Etude	43
B) Techniques adoptées pour la mise en évidence du pouvoir pathogène des "Staphylocoques"	48
C) Manipulations effectuées	50

Pages

II°) Résultats obtenus 53

A) Compte-Rendu complet d'un examen de saucisse 53

B) Résultats des recherches effectuées sur les saucisses fraiches 56

C) Résultats des recherches intéressant les saucisses soumises à un vieillissement 66

III°) Appréciations et Conclusions 74

A) Etude comparée des milieux sélectifs du "staphylocoque" et des techniques de caractérisation de son pouvoir pathogène 74

B) Commentaires sur la nature exacte des "Staphylocoques" 78

C) Conclusions sur la flore staphylococcique des saucisses. 81

D) Conclusions Générales 85

BIBLIOGRAPHIE 87